



ESTUDIO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE RESIDUOS AGROALIMENTARIOS Y SU EXTRACCIÓN A ALTA PRESIÓN

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los alimentos

Facultad de Ciencias

Grado en Biotecnología

Curso 2019/2020

Autora: Paula Benítez Gil

Tutora 1: M^a Teresa Fernández Ponce

Tutora 2: Ana Belén Díaz Sánchez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis tutoras Tere y Ana Belén por darme la oportunidad de trabajar con ellas. Muchas gracias al grupo de investigación de FSC, en especial a Casimiro, por contestarme tan rápido cuando, desesperada, buscaba algún trabajo que de verdad me gustase.

No sólo tengo que darle las gracias a Jose y a Jorge por ser mis compañeros de laboratorio, si no por ser mis amigos (y por aguantarme). Este julio sin vosotros habría sido interminable. Gracias por los consejos, las horas de charlas y los buenos momentos. Pepi, gracias por alegrarme las tardes en el laboratorio.

Gracias a todos mis compañeros de clase por estos cuatro años que, aunque no hayan acabado especialmente bien, han sido los mejores años de mi vida.

Gracias también a todas mis compañeras de piso (Dani tú también) por toda la felicidad que me habéis regalado. Miri, no sé qué habría sido de mi sin ti en estos años, gracias por todo lo que me das sin pedírtelo y por los cientos de recuerdos que tenemos juntas.

Por último, gracias a toda mi familia por confiar en mí. Mamá, papá, Rau, abuelo, abuela, qué bonito acabar esta etapa de vuestra mano (y de vuestras patitas, pin y pon).

ÍNDICE

1. PROPUESTA DE TFG ASIGNADA.....	1
2. LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
3. RESUMEN Y ABSTRACT.....	3
4. INTRODUCCIÓN.....	5
4.1. Uso de desechos procedentes de la industria agroalimentaria.....	5
4.1.1. Hoja de mango.....	5
4.1.2. Hollejo de uva tinta.....	6
4.1.3. Hoja de olivo.....	7
4.1.4. Cáscara de naranja	8
4.2. Fermentación en estado sólido (FES).....	8
4.3. Técnicas de extracción.....	10
4.3.1. Extracción con fluidos supercríticos (SFE).....	11
4.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE).....	11
4.3.3. Extracción asistida por ultrasonido (UAE).....	11
5. OBJETIVOS.....	13
6. SOLUCIÓN TÉCNICA.....	14
6.1. Materiales y métodos.....	14
6.1.1. Materias primas.....	14
6.1.2. Fermentación en estado sólido (FES).....	15
6.1.3. Extracción de compuestos polifenólicos.....	17
6.1.3.1. Extracción con fluidos supercríticos (SFE).....	17
6.1.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE).....	17
6.1.3.3. Extracción asistida por ultrasonido (UAE).....	18
6.1.3.4. Rendimiento de la extracción.....	19
6.1.4. Caracterización de los extractos.....	19
6.1.4.1. Análisis del contenido de polifenoles totales (TPC).....	19
6.1.4.2. Análisis del Índice de Actividad Antioxidante (AAI).....	21
6.1.5. Análisis estadístico.....	22
6.2. Resultados y discusión.....	22
6.2.1. Fermentación en estado sólido.....	22
6.2.2. Extracción de compuestos polifenólicos.....	27
6.2.2.1. Extracción con fluidos supercríticos (SFE).....	27
6.2.2.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE).....	28

6.2.2.3. Extracción asistida por ultrasonido (UAE).....	28
6.2.2.4. Estudio del rendimiento de la extracción.....	30
6.2.3. Estudio de la concentración de polifenoles (TPC).....	32
6.2.4. Estudio de la actividad antioxidante (AAI).....	37
7. CONCLUSIONES.....	39
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	40
9. BIBLIOGRAFÍA.....	41

1. PROPUESTA DE TFG ASIGNADA

Titulación: Grado en Biotecnología (GBT).

Curso académico: 2019/2020.

Título: Estudio del proceso de producción de sustancias bioactivas a partir de la fermentación en estado sólido de residuos agroalimentarios y su extracción a alta presión.

Tutoras 1 y 2: M^a Teresa Fernández Ponce y Ana Belén Díaz Sánchez.

Carácter: Trabajo de iniciación a la investigación.

Descripción: La extracción a alta presión ha tenido un alto impacto científico en las últimas décadas. Son numerosos los trabajos de investigación que proponen la aplicación de estas técnicas para la recuperación de compuestos de interés a partir de plantas. Estas técnicas de extracción son más sostenibles que las convencionales dado que minimizan el uso de disolventes orgánicos, facilitando la recuperación del soluto. De entre los productos más analizados aparecen numerosos estudios de extracción de polifenoles obtenidos de diferentes plantas. Estos compuestos presentan unas propiedades bioactivas muy interesantes en sectores como el alimentario, cosmético o farmacéutico. Es por ello que la búsqueda de nuevos productos y nuevas materias primas ricas en polifenoles resulta de gran interés. Dentro de los nuevos procesos empleados para la obtención de sustancias activas a partir de plantas o residuos agroalimentarios en los últimos años, la fermentación en estado sólido ha mostrado gran interés ya que consigue aumentar la cantidad y mejorar calidad de los polifenoles disponibles, incrementando el valor del producto generado. Por tanto, en el presente TFG se propone estudiar diversas técnicas de extracción a alta presión (extracción supercrítica, extracción con disolventes presurizados, y extracción mejorada) para la recuperación de un extracto rico en polifenoles a partir de residuos de agroalimentarios que han sido sometidos a un proceso de fermentación en estado sólido. Como materias primas se propone utilizar residuos agroalimentarios, como la cáscara de cítricos, u hojas de mango. Se plantea inicialmente el estudio del proceso de fermentación con hongos filamentosos como *Aspergillus awamori*. Se analizará la influencia de variables de operación como la humedad, la temperatura de fermentación, el pH y/o el tiempo de fermentación. Posteriormente se realizará el estudio del proceso de extracción de los productos obtenidos mediante técnicas de extracción a alta presión tales como extracción supercrítica, extracción mejorada y con líquidos presurizados y los extractos obtenidos serán caracterizados química y funcionalmente mediante técnicas de cromatografía líquida (HPLC o HPLC-MS) y de actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH con el fin de evaluar el incremento en el contenido de polifenoles y la bioactividad tras el proceso de fermentación.

2. LISTA DE ABREVIATURAS

AAI	Índice de actividad antioxidante (Antioxidant Activity Index)
AG	Ácido gálico
AGeq	Ácido gálico equivalente
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EC ₅₀	Concentración efectiva media (Effective Concentration)
DTE	Disolvente
FCS	Fermentación en cultivo sumergido
FES	Fermentación en estado sólido
PDA	Patata Dextrosa Agar
PLE	Extracción con líquidos presurizados (Pressurized Liquid Extraction)
SFE	Extracción con fluidos supercríticos (Subcritical Fluid Extraction)
TPC	Contenido total en polifenoles (Total Phenolic Content)
UAE	Extracción asistida por ultrasonido (Ultrasound Asisted Extraction)

3. RESUMEN

La industria agroalimentaria genera gran cantidad de residuos, que cada vez son mayores como consecuencia del incremento demográfico. Estos residuos, que normalmente son quemados, son ricos en compuestos con propiedades bioactivas que tienen un gran potencial en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. La fermentación en estado sólido supone una alternativa interesante para aumentar la cantidad y calidad de algunos de estos compuestos, como es el caso de los polifenoles, revalorizando el producto generado tras la fermentación.

En este Trabajo de Fin de Grado se sometieron a Fermentación en Estado Sólido (FES), empleando los hongos *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei* y *Botrytis cinerea*, distintos tipos de residuos agroalimentarios: hoja de mango, hoja de olivo, hollejo de uva tinta, cáscara de naranja agria y cáscara de naranja dulce. Se puso de manifiesto que todos los hongos crecían sobre los residuos evaluados excepto *T. reesei* y *B. cinerea* en naranja dulce.

Tras el proceso de fermentación los residuos fueron sometidos a una extracción para recuperar los compuestos bioactivos. Se evaluaron diferentes técnicas de extracción como la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción con líquidos presurizados (PLE) y la extracción asistida por ultrasonido (UAE). En el caso de las técnicas a alta presión, se obtuvieron rendimientos muy bajos con CO₂ supercrítico y las extracciones con líquidos presurizados (agua y etanol) requerían mucho tiempo y gasto de disolvente. La UAE, por el contrario, resultó ser eficiente para todos los residuos evaluados que, además, presenta la ventaja de ser una técnica rápida y que consume pequeños volúmenes de disolvente. La calidad de los extractos obtenidos por UAE fue evaluada teniendo en cuenta el rendimiento de extracción, el contenido total en polifenoles (TPC) mediante el método de Folin-Ciocalteu y espectrofotometría a 280 nm y la capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH.

El rendimiento de extracción que más aumentó respecto a la materia prima sin fermentar fue el del hollejo fermentado con *T. reesei*, pasando de un 12,48 a un 18,38 %. En cuanto al contenido total de polifenoles, el mango fermentado con *T. reesei* es el residuo que presentó mayor cantidad de polifenoles y mayor índice de actividad antioxidante. Por último, entre los residuos estudiados cabe destacar la naranja agria, que mostró un incremento substancial en el contenido de polifenoles tras su fermentación con *A. awamori*, pasando de 0,14 a 0,33 g AGeq/g extracto, sin embargo, debido a efectos antagónicos entre los compuestos extraídos, no se observaron cambios significativos en la actividad antioxidante.

ABSTRACT

The agri-food industry generates a large amount of waste, which is constantly growing because of the population increase. These residues, which are normally burned, are rich in compounds with bioactive properties that have great potential in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. Solid-state fermentation is an interesting alternative to increase the quantity and quality of some of these compounds, as is the case with polyphenols, revaluing the product generated after fermentation.

In this End of Grade Work different types of agri-food residues: mango leaf, olive leaf, red grape sock, bitter orange peel and sweet orange peel underwent Solid-State Fermentation (SSF), using the fungi *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei* y and *Botrytis cinerea*. It became clear that all fungi grew on the residues evaluated except *T. reesei* and *B. cinerea* in sweet orange.

After the fermentation process the residues were subjected to extraction to recover the bioactive compounds. Different extraction techniques were evaluated such as extraction with supercritical fluids (SFE), extraction with pressurized liquids (PLE) and ultrasound-assisted extraction (UAE). In the case of high-pressure techniques, very low yields were obtained with supercritical CO₂ and extractions with pressurized liquids (water and ethanol) required a lot of time and solvent expenditure. UAE, by contrast, proved to be efficient for all the residues evaluated and, in addition, it is a fast technique that consumes small volumes of solvent. The quality of the extracts obtained by UAE was evaluated considering extraction performance, total polyphenol content (TPC) using the Folin-Ciocalteu method and spectrophotometry at 280 nm and antioxidant capacity through the DPPH assay.

The extraction yield that increased the most compared to the unfermented feedstock was the grape pomace fermented with *T. reesei*, raising from 12.48 to 18.38%. As for the total content of polyphenols, mango fermented with *T. reesei* is the feedstock with the highest amount of polyphenols and antioxidant activity index. Finally, it is also worth noting sour orange among the residues studied, which showed a substantial increase in the content of polyphenols after fermentation with *A. awamori*, from 0.14 to 0.33 g AGeq/ g extract, however, due to antagonistic effects among the extracted compounds no significant changes in antioxidant activity were observed.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Uso de desechos procedentes de la industria agroalimentaria

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) se estima que para el 2050 la producción global de alimentos aumente un 60 % debido al incremento demográfico. Con este incremento, la cantidad de residuos generados en la industria agroalimentaria será aún mayor. Para implementar un modelo de economía circular es necesario darles uso a los residuos generados. Algunos residuos, como los generados en la obtención del aceite de oliva, los procedentes de la viticultura y otros residuos agroalimentarios como cáscaras y hojas, son unas fuentes excelentes de antioxidantes naturales y de compuestos fenólicos (Leite et al., 2019).

4.1.1. Hoja de mango

El mango (*Manguifera indica* L.) es una de las frutas tropicales más importantes en todo el mundo, cuya producción supera los 38 millones de toneladas al año (Fernández-Ponce et al., 2012). Uno de los principales subproductos de la producción de esta fruta son las hojas del árbol del mango, generadas en la poda anual. Normalmente estos residuos son quemados para obtener energía o para la mejora de los suelos (Fernández-Ponce et al., 2012). Sin embargo, las **hojas de mango** tienen usos medicinales, habiéndose utilizado a lo largo de la historia para el tratamiento de la diabetes y de infecciones respiratorias en la medicina china, india y africana (Zhang et al., 2019).

Se ha demostrado que la corteza del árbol del mango y sus hojas tienen un alto contenido de compuestos fenólicos y un gran potencial antioxidante (Fernández-Ponce et al., 2012). El polifenol más abundante en sus hojas es la mangiferina (figura 1), también conocida como un “superantioxidante”. Los extractos de la hoja de mango son muy usados en la industria agroalimentaria como conservante de alimentos, en la industria cosmética como anti-edad y en la industria farmacéutica para la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Fernández-Ponce et al., 2013).

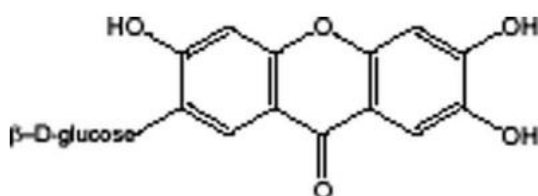


Figura 1. Estructura de la mangiferina (Martin & He, 2009).

Entre los compuestos fenólicos presentes en las hojas de mango se encuentran ácidos fenólicos, flavonoides, xantonas, benzofenonas y galotaninas. Estos compuestos presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antifúngica, antidiabética, antipirética, inmunomodulatoria, analgésica y hepatoprotectiva (Fernández-Ponce et al., 2015; Jhaumeer Laulloo et al., 2018; Saleem et al., 2019). Además, previenen enfermedades como el cáncer, el Alzheimer, la diabetes, la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares (Fernández-Ponce et al., 2014).

4.1.2. Hollejo de uva tinta

Otra de las materias primas evaluadas en este TFG es el **hollejo de uva tinta** (*Vitis vinifera*). El 75 % de la producción de uva mundial está destinado a la producción de vino, generándose unas 1200 toneladas de hollejo por año (Beres et al., 2017). El hollejo es el subproducto más abundante en esta industria, compuesto de la piel, semillas y tallos de la uva, representando el 25 % del peso total de la uva. España es el tercer país europeo productor de vino (3,82 millones de litros al año), después de Francia e Italia (Beres et al., 2017; Teixeira et al., 2014). En el 2016, el 5 % de los cultivos españoles estaban destinados a la vid (Ayuda et al., 2020).

El hollejo es rico en un amplio rango de polifenoles, formalmente conocidos como taninos. Los compuestos predominantes en la uva son los flavonoles (figura 2), una clase de flavonoides. La catequina es uno de los principales flavonoles y se encuentra en las semillas y en la piel de la uva, aunque también hay trazas en la pulpa. La composición de polifenoles depende de cada parte del hollejo, así como también varía dependiendo de la variedad de uva, de sus condiciones de crecimiento, de la madurez con la que se recolecta y del tiempo de fermentación (Brenes et al., 2016). Además, se ha comprobado que el contenido total de polifenoles (TPC) es mayor en las semillas que en las pieles (Friedman, 2014).

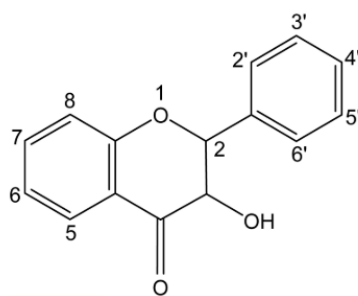


Figura 2. Estructura general de los flavonoles presentes en el hollejo de uva tinta (Stalikas, 2007).

Gómez-Brandón et al. clasifican los compuestos fenólicos presentes en la uva y en el vino en tres categorías principales que son: ácidos fenólicos, flavonoides simples (incluyendo aquí catequinas, flaconoles y antocianinas) y taninos y proantocianidinas (Gómez-Brandón et al., 2019). El principal ácido fenólico es el ácido gálico, el principal estilbeno es el trans-resveratrol

y el principal flavonol es la rutina. Estas moléculas presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antidepresiva, antitrombótica y anticancerígena (Kalli et al., 2018).

4.1.3. Hoja de olivo

Otra de las materias primas usadas en este trabajo es la **hoja de olivo** (*Olea europaea*). Este residuo está compuesto por una mezcla de hojas (25 % en peso), pequeñas ramas (50 % en peso) y ramas más gruesas (25 % en peso) generadas en la poda de los olivos. Las proporciones pueden variar dependiendo de las condiciones de crecimiento, la edad del árbol y de la poda realizada por cada agricultor. También se genera durante la cosecha y la limpieza de las aceitunas recolectadas. Se estima que cada árbol del mundo produce 25 kg de este subproducto al año. Las hojas de olivo son usadas para la obtención de energía mediante la combustión directa, para la alimentación animal cuando están frescas y como materia prima para la fabricación de pellets (Berbel & Posadillo, 2018; Talhaoui et al., 2015). El extracto acuoso de hoja de olivo era usado a mediados del siglo XIX para reducir la fiebre y para prevenir o curar los síntomas de la malaria (Guinda, 2006).

España es el país con el mayor número de olivos. Se estima que la producción mundial de aceite de oliva para el consumo humano fueron 2,39 millones de toneladas en el año 2014, de las cuales 1,53 millones fueron producidas en los países de la Unión Europea. Para los productores de aceite de oliva, las hojas de olivo les generan un gran coste debido a su almacenamiento y su eliminación. Por esta razón, es necesaria la revalorización de este subproducto teniendo en cuenta que son una fuente importante para la producción de nutraceuticos (Talhaoui et al., 2015). Los nutraceuticos son compuestos cuyo consumo ha sido relacionado con la prevención y/o tratamiento de algunas enfermedades en humanos (Valenzuela B. et al., 2014).

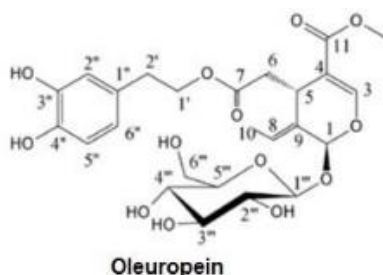


Figura 3. Estructura de la oleuropeína (Larussa et al., 2019).

Aunque la mayor cantidad de compuestos fenólicos se encuentran en las aceitunas, muchos estudios han encontrado un contenido importante de compuestos fenólicos en las hojas de olivo. Entre los más abundantes en las hojas se encuentran la oleuropeína, el tirosol, el hidroxitirosol y la rutina (Guinda, 2006; Žugčić et al., 2019).

La oleuropeína (figura 3) es el componente fenólico más abundante de las hojas de olivo. El contenido de polifenoles de estas hojas les da propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, antivirales e hipoglucémicas (Barbaro et al., 2014). La oleuropeína tiene un efecto vasodilatador que mejora la arritmia y también se ha comprobado su potencial antioxidante y antiinflamatorio (Guinda, 2006).

4.1.4. Cáscaras de naranja

Los cítricos son las frutas más producidas, siendo la naranja un 8,5 % de la producción de frutas total, alcanzando los 68 millones de toneladas al año en todo el mundo (Gaïnd, 2017; Tao et al., 2011). Es una de las frutas más consumidas desde la antigüedad por ser una excelente fuente de vitaminas, especialmente la vitamina C (Dosoky & Setzer, 2018).

La **cáscara de la naranja** representa un 50 % del peso de la naranja y es uno de los mayores residuos generados en el procesado de esta fruta. Se suele usar para la extracción de pectina y para alimentación animal, pero el secado de la pectina es muy caro y su bajo porcentaje en proteínas hace que no sea el residuo más deseado para dar de comer a los animales (Gaïnd, 2017). Por estas razones, es necesario la búsqueda de una nueva aplicación para el aprovechamiento de las cáscaras de naranja.

En cuanto a los polifenoles, los cítricos son especialmente ricos en flavonoides, siendo las flavanonas las más abundante entre ellos. En las cáscaras, la naringerina y la hesperidina son las principales, que presentan efectos antiinflamatorios y anti carcinogénicos, beneficiosos para la salud (Espinosa-Pardo et al., 2017). También presentan propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antialérgicas (Farag et al., 2020). El contenido en flavanonas de la naranja agria (*Citrus aurantium*) es mayor al de la naranja dulce (*Citrus sinensis*), siendo 48 mg/100 g y 17 mg/100 g, respectivamente. La segunda clase más abundante de flavonoides son las polimetoxiflavanonas, que se encuentran en una concentración menor que las flavanonas, pero su actividad biológica es mayor (Farag et al., 2020).

4.2. Fermentación en estado sólido (FES)

La fermentación en estado sólido (FES) es la fermentación que se lleva a cabo en ausencia, o casi ausencia, de agua libre. La humedad está contenida en el sustrato y esta debe ser suficiente para que el microorganismo sea capaz de crecer con normalidad y mantener su metabolismo (Bellon-Maurel et al., 2003; Díaz et al., 2007; Orzua et al., 2009). Esta técnica ha sido usada durante cientos de años para la preparación de alimentos como la salsa de soja y el tempeh en oriente y el pan, el yogur y el queso en occidente (A. Díaz et al., 2013). Para la FES se pueden usar bacterias, hongos y levaduras (Martins et al., 2011), sin embargo, los hongos filamentosos son

los más usados debido a su capacidad de crecer en entornos con poca humedad, de colonizar los espacios entre las partículas y de secretar enzimas capaces de hidrolizar el sustrato (Marzo et al., 2019).

La FES, en el campo de la biotecnología ambiental, es usada en bioprocesos como la biodegradación de compuestos tóxicos, biotransformación de residuos agrícolas y la biorremediación, así como para la producción de biocombustibles, surfactantes y bioplaguicidas (Cruz, 2016; Pandey et al., 2000). Por otro lado, en el campo de la biotecnología alimentaria se usa para la producción de enzimas, antibióticos, alcaloides, ácidos orgánicos y otros productos de valor añadido (Díaz et al., 2007).

En países con una agricultura intensiva se producen grandes volúmenes de residuos agroalimentarios. Estos son ricos en azúcares, que por su naturaleza orgánica son fácilmente accesibles y asimilados por los microorganismos. Por esta razón, muchos de los desechos de la industria agroalimentaria son sustratos apropiados para la producción de compuestos de valor añadido mediante FES (Rodríguez Couto, 2008). Al utilizar estos residuos se disminuye el impacto ocasionado al medio ambiente debido al CO₂ producido en su combustión o al CH₄ producido por su digestión anaerobia, aumentando la emisión de gases de efecto invernadero (Masutti et al., 2016; Sadh et al., 2018).

Se han desarrollado muchos trabajos de investigación sobre la mejora de la disponibilidad de las sustancias bioactivas presente en residuos como el bagazo de caña de azúcar, las cosetas de remolacha, la piel de patata, la cáscara de piña y la cáscara de granada, entre otros. En muchos de estos estudios se comprobó que después de la FES los polifenoles presentan mayor disponibilidad, obteniendo mayor concentración de estos en los extractos de los residuos fermentados (Sadh et al., 2018). Su disponibilidad aumenta debido a que en la FES el hongo produce enzimas que hidrolizan la matriz vegetal, haciendo que los polifenoles que están unidos a celulosa, hemicelulosa, pectina y proteínas estructurales se liberen y puedan ser extraídos por el solvente (Torres-León et al., 2019).

La fermentación en cultivo sumergido (FCS) se ha usado para la obtención de muchos productos de interés. Entre las **ventajas** de la FES frente a la FCS se encuentran las siguientes (Díaz et al., 2007; Díaz Sánchez, 2009; M. A. et al., 2011; Rodríguez Couto, 2008):

- Se usan polímeros insolubles (sólidos) de sustrato y también se metabolizan los azúcares que presenten estos sustratos. Además, los sólidos empleados suelen ser residuos de la industria agroalimentaria. En la FCS sólo se usan azúcares solubles.
- Tiene un consumo más limitado de agua que la FCS.

- Es fácil la aireación en la fermentación al contrario de lo que ocurre en la FCS, donde se requieren grandes niveles de aireación para tener una buena concentración de oxígeno disuelto en el medio.
- Existe un riesgo bajo de contaminación, debido a que la actividad del agua es baja en comparación con la existente en FCS.
- El consumo de energía es menor en la FES.
- Los equipos tienen bajo coste respecto a los usados en la FCS y, además, no tienen problemas de generación de espuma.
- No se generan efluentes contaminantes. En la FCS se generan grandes volúmenes de efluentes contaminantes.
- Se produce hasta una concentración de 100-300 g/L de producto respecto a los 30-80 g/L de la FCS.
- El volumen del reactor usado en la FES es mucho menor que en la FCS.

A pesar de la larga lista de ventajas de la FES, también tiene ciertas **desventajas** respecto a la FCS (A. B. Díaz et al., 2016; Díaz Sánchez, 2009; Rodríguez Couto, 2008; Wang et al., 2019):

- La capacidad de transferencia de calor es más baja que en la FCS. Se han usado biorreactores de lecho fijo, de lecho fluidizado, de tambor rotativo y otros con agitación y en todos ellos la transmisión de calor era dificultosa.
- El proceso debe ser discontinuo, siendo el de la FCS en continuo.
- No se pueden usar reactores de gran volumen, por lo que se obtiene menor cantidad de producto que en la FCS. Además, la falta de conocimiento relacionada con el diseño y la operación de biorreactores para la FES hacen que el escalado sea un gran inconveniente.
- En la FES el medio es heterogéneo, produciéndose distintos gradientes de temperatura, humedad, concentración del sustrato, pH y aireación que provocan diferencias en la concentración de los productos obtenidos.

4.3. Técnicas de extracción

Durante los últimos años, se han estudiado nuevas tecnologías de extracción más respetuosas con el medio ambiente, con las cuales se pretende ahorrar energía, tiempo y disolvente. En este tipo de extracciones se suelen usar solventes no tóxicos como el agua, el etanol o el CO₂. Entre las nuevas tecnologías estudiadas se encuentran la extracción con fluidos supercríticos, la extracción asistida por microondas, la extracción de campo eléctrico pulsantes, la extracción asistida por enzimas y la extracción asistida por ultrasonido (Boukroufa et al., 2015; Fomo et al., 2020; Žugčić et al., 2019).

4.3.1. Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia que se mantiene en una temperatura y presión por encima de su punto crítico. Sus propiedades físicas como la viscosidad, difusividad, constante dieléctrica, densidad y tensión superficial cambian significativamente respecto a sus propiedades en condiciones atmosféricas (Getachew et al., 2020).

El principal disolvente usado en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética en la extracción con fluidos supercríticos es el CO₂, debido a su alta selectividad, rapidez y seguridad ambiental (Espinosa-Pardo et al., 2017). Sin embargo, se requiere gran cantidad de co-disolvente (normalmente metanol, etanol o agua) para extraer compuestos polares, como es el caso de los polifenoles (Xynos et al., 2012). Además, el CO₂ presenta un punto crítico fácilmente alcanzable (31,4 °C y 73,8 bares), no es tóxico, está disponible con una alta pureza y es fácil separar el gas del extracto debido a que se evapora en condiciones atmosféricas (Getachew et al., 2020).

4.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE)

La extracción con líquidos presurizados (PLE) usa temperaturas elevadas para aumentar la cinética del proceso de extracción, además de una alta presión para que el solvente permanezca en estado líquido (Xynos et al., 2012). El uso de solventes por debajo de su punto de ebullición atmosférico mejora su solubilidad y la transferencia de materia en el proceso. Además, es un proceso eficiente, con bajo consumo de energía y de solventes orgánicos (Fernández-Ponce et al., 2015).

Normalmente en este tipo de extracción se usa agua, metanol, acetona y hexano como solventes (Oreopoulou et al., 2019). Sin embargo, hay otros estudios que también han usado mezclas hidroalcohólicas y etanol, siendo el etanol el disolvente que más compuestos recuperaba de la materia prima (Fernández-Ponce et al., 2015).

4.3.3. Extracción asistida por ultrasonido (UAE)

Los ultrasonidos de baja frecuencia (20-200 kHz) son ondas acústicas que se encuentran por encima de la capacidad de audición del oído humano, pero por debajo de las ondas microondas. Cuando estas ondas atraviesan un medio se produce la cavitación, fenómeno que produce burbujas en el interior de las células que implosionan, liberando una gran cantidad de energía que debilita la membrana celular (Cravotto et al., 2018; Sirohi et al., 2020). Las membranas se alteran provocando que los compuestos contenidos en las células se difundan en el disolvente (Boukroufa et al., 2015).

Las principales ventajas de la extracción asistida por ultrasonido son su bajo consumo de energía, de disolvente y de tiempo. Tiene una alta reproducibilidad y presenta mejores

rendimientos que las extracciones convencionales, las extracciones asistidas por microondas y las asistidas por enzimas, además de ser más rápido. Es un método escalable, por lo que su aplicación en la industria no sería un inconveniente. Además, no requiere el uso de solventes tóxicos y se pueden extraer compuestos termosensibles, dado que no alcanza altas temperaturas (Khan et al., 2010; Sirohi et al., 2020; Žugčić et al., 2019). Los productos naturales extraídos con este método presentan una gran pureza, por lo que no es necesario un postratamiento, reduciendo el coste del proceso (Getachew et al., 2020).

Varios compuestos bioactivos han sido extraídos de forma eficiente con este método de extracción a partir de frutas, hortalizas y de sus residuos, así como de otras hierbas, especias y semillas oleaginosas (Wen et al., 2020). Entre estos compuestos bioactivos, se encuentran los polifenoles. En una publicación reciente, Dzah et al. apuntan que las temperaturas por encima de los 70 °C provocan una bajada del contenido total en polifenoles debido a su degradación oxidativa, por lo que la extracción asistida por ultrasonido es un método efectivo para evitar su degradación (Dzah et al., 2020).

5. OBJETIVOS

Este TFG se desarrolló dentro del grupo de investigación de “Análisis y Diseño de Procesos con Fluidos Supercríticos” junto con el grupo de investigación “Ingeniería y Tecnología de Alimentos”, del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos.

El objetivo principal de este TFG consiste en revalorizar diferentes residuos agroalimentarios de interés mediante la técnica de fermentación en estado sólido y recuperar los polifenoles presentes en dichos residuos mediante técnicas como la extracción con fluidos supercríticos, la extracción con líquidos presurizados y la extracción asistida por ultrasonido.

Para dar cumplimiento a este objetivo principal se tuvieron en cuenta los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de la fermentación en estado sólido en la recuperación de polifenoles en distintos residuos agroalimentarios, tales como hoja de mango, hoja de olivo, hollejo y cáscaras de naranja dulce y agria y empleando los hongos *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei* y *Botrytis cinerea*.
2. Analizar el efecto de la extracción con CO₂ supercrítico, la extracción con agua y etanol presurizados y la extracción asistida por ultrasonido de los diferentes residuos agroalimentarios tras la fermentación en estado sólido en la recuperación de los polifenoles.
3. Determinar el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos.
4. Evaluar estadísticamente el efecto combinado de la fermentación en estado sólido y la extracción asistida con ultrasonido en el contenido en polifenoles y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de las diferentes materias primas estudiadas.

6. SOLUCIÓN TÉCNICA

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Materias primas

Las materias primas estudiadas fueron **hojas de mango** (*Manguifera indica* L.) proporcionadas por el Instituto para la Horticultura Mediterránea y Subtropical ‘La mayora’ (IHSM), del consejo Nacional de Investigación de España (CSIC, Málaga, España); **hollejo de uva tinta** (*Vitis vinifera*) obtenido de las Bodegas Luis Pérez (Jerez, España); **hojas de olivo** (*Olea europaea*) de la Olivarera San José de Lora de Estepa Sca Coop (Sevilla, España); **cáscara de naranja agria** (*Citrus aurantium*) obtenida de los árboles de Puerto Real, España y **cáscara de naranja dulce** (*Citrus sinensis*) proporcionadas por la Cafetería de la Facultad de Ciencias de la Educación del Campus de Puerto Real de la Universidad de Cádiz (Puerto Real, España). Las hojas de mango se recolectaron en el año 2018, el hollejo y las hojas de olivo en el 2019 y las cáscaras de naranja agria y dulce, en el 2020. La figura 4 muestra las diferentes materias primas evaluadas.

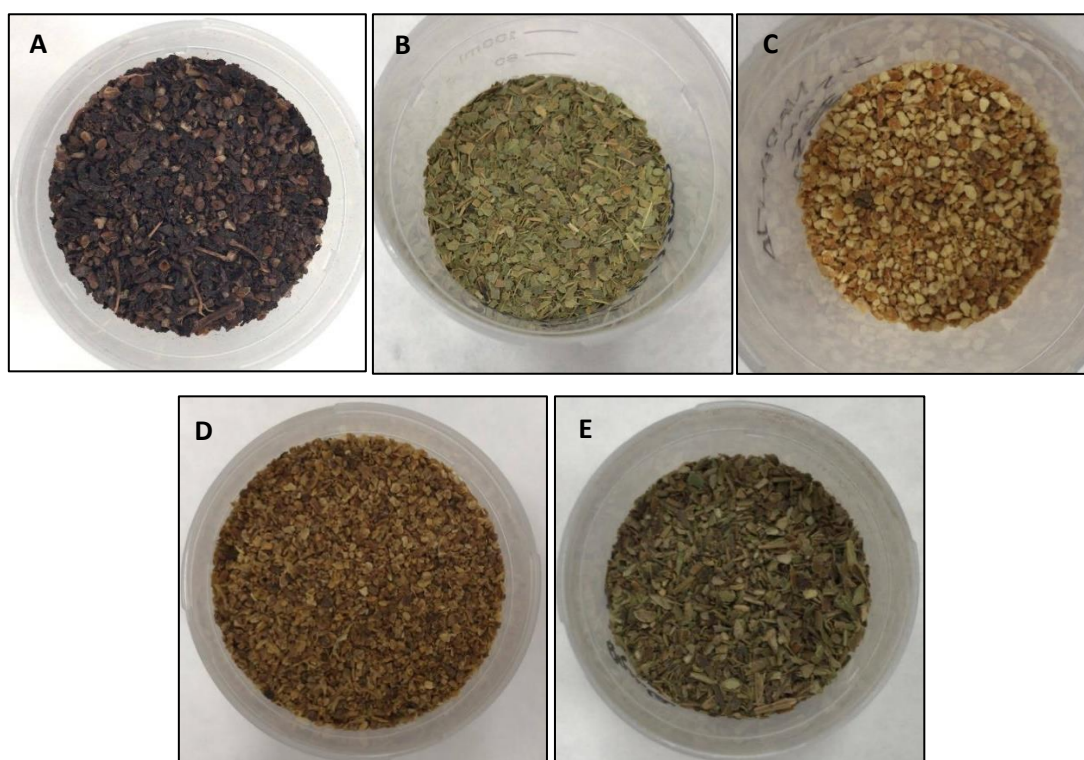


Figura 4. Materias primas tamizadas, siendo A el hollejo de uva tinta, B las hojas de mango, C la cáscara de naranja agria, D la cáscara de naranja dulce y E las hojas de olivo.

Las hojas de mango, de olivo y el hollejo se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron guardadas hasta su uso en bolsas de plástico a temperatura ambiente. Estas materias primas fueron trituradas en una licuadora Bosch modelo MMB2001 para el posterior tamizado. A modo de ejemplo se presenta en la figura 5 las hojas de mango y la etapa de triturado. Las cáscaras de

ambos tipos de naranjas se trituraron y después se dejaron secar a temperatura ambiente sobre un papel de filtro.



Figura 5. A) Hojas de mango y B) su triturado.

Después del triturado se conservaron las materias primas a temperatura ambiente en botes de plástico de 100 mL y se tamizaron en distintos tamaños: 2,00, 1,50, 0,75, 0,50 y 0,35 mm. En la figura 6 se muestran como ejemplo las hojas de olivo tamizadas con las diferentes mallas empleadas. Con este tamizado se pretendía que el tamaño de partícula de todos los sustratos fuese homogéneo a la hora de llevar a cabo la FES, seleccionando las fracciones recogidas en los tamices intermedios de 1,50 y 0,75 mm, mezclando la misma cantidad en gramos de ambos. Después se pesaron 5 gramos, por triplicado, de cada materia prima y se esterilizaron en el autoclave en botes ámbar de vidrio de 25 mL, a 120 °C, 1,2 atm y durante 20 minutos.



Figura 6. Hojas de olivo tamizadas.

6.1.2. Fermentación en estado sólido (FES)

Los hongos usados para la fermentación en estado sólido fueron *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei* y *Botrytis cinerea*.

A. awamori se cultivó en medio PDA (4 g/L de extracto de patata, 20 g/L de dextrosa y 15 g/L de agar) a 30 °C y las esporas se recogieron rascando la placa y empleando una disolución de cloruro

sódico (NaCl) al 0,9 % p/v. Las esporas no utilizadas se conservaron a -20 °C en viales estériles con un 25 % de glicerol. Las esporas de *T. reesei* se cultivaron, recogieron y conservaron del mismo modo.

Para el cultivo de *B. cinerea* se partió de una solución de esporas glicerizada, que se encontraba a -20 °C, que se sembró en PDA sin observar crecimiento, pero si lo hizo en agar malta. Dicho medio contiene 20 g/L glucosa, 20 g/L de extracto de malta, 1 g/L de peptona y 20 g/L de agar. Una vez inoculado, se dejó crecer el hongo a 25 °C. El procedimiento de recolección de las esporas de *B. cinerea* fue el mismo que para *T. reesei* y estas fueron recolectadas cuando se observaron esporangios al microscopio óptico (Leica DM E).

La humedad del sólido se ajustó con una solución que contenía 2,4 g/L de urea, 9,8 g/L (NH₄)₂SO₄, 5,0 g/L KH₂PO₄, 0,001 g/L de FeSO₄·7H₂O, 0,0008 g/L de ZnSO₄·7H₂O, 0,004 g/L de MgSO₄·7H₂O y 0,001 g/L de CuSO₄·5H₂O (A. B. Diaz et al., 2016). Se preparó 1 L de disolución y se esterilizó en el autoclave a las mismas condiciones que las materias primas.

Para calcular el porcentaje de humedad de cada uno de los residuos, se secaron en una estufa a 60 °C durante 7 días y se calculó la diferencia de peso entre el sólido húmedo y el sólido seco. Una vez obtenido este dato, se procedió a calcular, con la siguiente ecuación (Eq. 1), la cantidad de disolución de humedad que había que añadirle a cada materia prima para llevar a cabo la FES con una humedad del 70 %.

$$\% \text{ humedad} = \frac{g_{H_2O \text{ añadir}} + g_{H_2O \text{ contenido MP}}}{g_{H_2O \text{ añadir}} + g_{\text{sólido húmedo}}} \times 100 \quad [1]$$

El número de células inoculadas a cada placa fue de 5·10⁷ células, empleando para su recuento una cámara Neubauer. Cada experimento se realizó por triplicado.

A continuación, se detallan los pasos seguidos para llevar a cabo la fermentación. Todo el protocolo se llevó a cabo en esterilidad en una cabina de seguridad biológica.

1. Se prepararon 15 placas Petri de 9 cm de diámetro, estériles.
2. Se le añadió a cada placa el volumen de disolución de humedad necesario para que la humedad inicial de cada residuo fuese del 70 %.
3. Se le añadió a cada placa el volumen de disolución de esporas para que la placa tuviera 5·10⁷ células.
4. Se homogeneizó la mezcla de esporas y disolución de la humedad con movimientos circulares de la placa y se intentó que cubriese toda la superficie de esta.
5. Se añadieron 5 gramos de materia prima a cada placa, intentando que la disolución de la humedad se distribuyera de forma homogénea en el sólido.

6. Se rotularon las placas y se incubaron durante seis días a 30 °C para *A. awamori* y *T. reesei* y a 25 °C para *B. cinerea*.

Cada 24 horas se realizaron fotografías a las placas para realizar el seguimiento de su evolución.

6.1.3. Extracción de compuestos polifenólicos

6.1.3.1. Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

El primer paso para la extracción con CO₂ supercrítico fue encender el criotermostato, que debía estar por debajo de 5 °C para poder operar. A continuación, se pesaron 20 g de materia prima tamizada y se introdujeron en un cartucho de papel de filtro que se colocó en el extractor. Después, se establecen las condiciones de trabajo: 20 g/min de CO₂, 20 % de etanol a 10 MPa y 55 °C durante 3 horas. Estas condiciones se seleccionaron teniendo en cuenta estudios previos del mismo grupo de investigación en el que se realizó este TFG (Fernández-Ponce et al., 2012). Se trabajó en continuo, por lo que la presión de la BPR fue la misma que la presión de trabajo.

Una vez se estabilizaron las temperaturas del equipo y del criotermostato se abrió la botella de CO₂ y se pusieron en funcionamiento la bomba de CO₂ y la bomba de co-disolvente. La BPR se abrió cuando el reactor alcanzó la presión fijada, empezando así la extracción en continuo.

Transcurrido el tiempo de extracción se pararon las bombas, se cerró la botella de CO₂ y se apagaron los controladores de la temperatura. Se despresurizó el sistema mediante la apertura de la BPR.

6.1.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE)

Las extracciones de hojas de mango y de hollejo de uva tinta, con agua miliQ y con etanol, se llevaron a cabo en un equipo de la firma Thar Technology, en el modelo SF2000.

Antes de comenzar la extracción, fue necesario asegurarse de que no había burbujas de aire en las conducciones del equipo, por lo que se llevó a cabo un proceso de purga. A continuación, la materia prima triturada se insertó en un cartucho hecho de papel de filtro, con unas dimensiones adecuadas al tamaño del reactor. Se introdujo una cantidad de materia prima de entre 100-500 g. Las condiciones de trabajo se introdujeron en el software "Process Suite" siendo una presión de trabajo de 200 bar y una temperatura de 80 °C. El tiempo de extracción fue de 12 h en modo estático. Estas condiciones se seleccionaron teniendo en cuenta estudios previos realizados por el grupo de investigación "Análisis y Diseño de Procesos con Fluidos Supercríticos" (Fernández-Ponce et al., 2015).

Una vez introducidos en el software los parámetros de operación, se comienza a bombear el co-disolvente (agua miliQ o etanol) hasta que el reactor alcanza la temperatura y presión de trabajo,

que se mantienen constante gracias la válvula BPR. La bomba se apaga manualmente cuando se alcanzan los parámetros en los valores fijados y se deja el equipo extrayendo el tiempo necesario. Una vez finalizado el tiempo de extracción, se despresuriza el sistema y se recupera el extracto.

6.1.3.3. Extracción asistida por ultrasonido (UAE)

Para las extracciones con ultrasonido se usó un baño de ultrasonidos modelo 514 de SELECTA de 50 kHz, mostrado en la figura 7A. El disolvente usado fue agua destilada con etanol (96 % de pureza, Panreac) en proporción 1:1.

En el caso de los sustratos sin fermentar, se añadieron 5 gramos a un bote ámbar de 50 mL. Después, se añadieron 50 mL de disolvente y se dejó en el baño durante 30 minutos (figura 7A). El extracto se filtró a vacío (figura 7B) con un matraz Kitasato y un embudo Büchner, empleando un filtro de celulosa (calidad 591, Albet LabScience). Sin desechar el sustrato, se le volvieron a añadir 50 mL de disolvente, haciendo una segunda extracción, que se volvió a filtrar a vacío. Los extractos de ambas extracciones se unieron y se almacenaron en tarros de muestras de 100 mL a 4 °C hasta su posterior análisis.

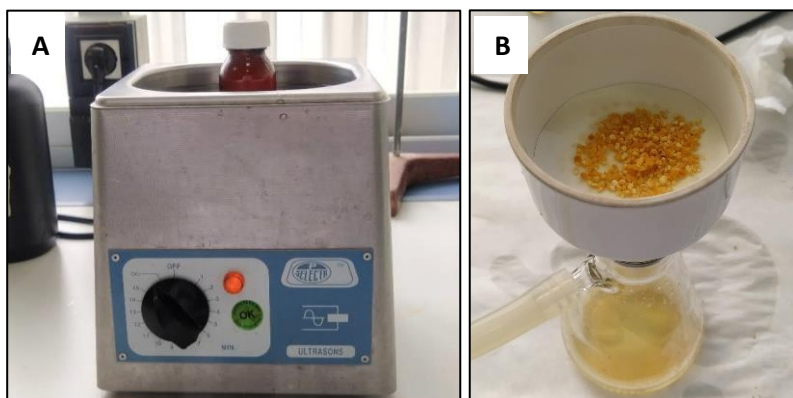


Figura 7. A) Baño de ultrasonidos y B) filtración a vacío de naranja agria.

En el caso de los sustratos fermentados se llevó a cabo el mismo procedimiento, traspasando la materia prima fermentada de la placa Petri al bote ámbar. Para realizar los distintos cálculos se tuvo en cuenta la humedad remanente en el sólido a extraer, que se determinó mediante gravimetría. Para ello, se traspasó el sólido fermentado a una placa Petri de la que ya se conocía el peso. Al peso obtenido de la placa Petri con el sólido fermentado se le restaron los gramos pertenecientes al peso de la placa y los 5 g de materia prima.

Las concentraciones de los extractos se determinaron mediante gravimetría tras secar 5 mL de cada extracto en el rotavapor en matraces redondos, a unos 70 °C.

6.1.3.4. Rendimiento de la extracción

El rendimiento es el parámetro que mide la masa de extracto seco que se obtiene en función de la cantidad de materia prima usada inicialmente.

La ecuación para el cálculo de la concentración de extracto usada fue la siguiente (Eq. 2).

$$[\text{extracto}] \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{\text{peso matraz con extracto seco (g)} - \text{peso matraz vacío (g)}}{\text{volumen secado (mL)}} \quad [2]$$

Una vez conocida la concentración del extracto, se calculó el rendimiento de cada extracción con la siguiente ecuación (Eq. 3).

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{[\text{extracto}] \left(\frac{g}{mL} \right) \times \text{Volumen disolvente (mL)}}{\text{peso extraído (g)}} \times 100 \quad [3]$$

Donde el peso extraído es el peso de materia prima introducido en los botes ámbar (5 g) y el volumen de disolvente es 100 mL para los extractos sin fermentar y 100 mL más la humedad remanente después de la fermentación en los extractos fermentados.

6.1.4. Caracterización de los extractos

Para la caracterización de los extractos se tuvo en cuenta el contenido total de polifenoles y la actividad antioxidante de los extractos. A continuación, se describen los métodos usados.

6.1.4.1. Análisis del contenido de polifenoles totales (TPC)

Para el análisis del contenido total de polifenoles de los extractos se usaron dos metodologías.

Por un lado, se siguió el método de **Folin-Ciocalteu**. Primero, se preparó una solución madre de ácido gálico en agua destilada a una concentración de 1000 ppm. Se realizaron 7 diluciones a partir de la disolución madre a 300, 150, 100, 75, 50, 25 y 15 ppm, que se usaron para representar una recta patrón y calcular las concentraciones de polifenoles en los extractos con la ecuación de dicha recta.

Cada extracto se analizó por triplicado, al igual que cada punto de la recta patrón, el blanco y el control. Para las muestras de extracto y la recta patrón se añadían a cada pocillo de una microplaca 200 µL de agua miliQ, 12,5 µL del reactivo Folin-Ciocalteu y 12,5 µL del extracto o del patrón. Para analizar los extractos se diluyeron a 1000 y 2000 ppm, a partir de las concentraciones calculadas en la ecuación [2]. Para el blanco se añadieron 225 µL de miliQ y para el control 212,5 µL de miliQ y 12,5 µL de Folin-Ciocalteu. Por último, en el ensayo se añadieron los blancos de los extractos, a los cuales se les añadía 212,5 µL de miliQ y 12,5 µL de extracto. El reactivo de Folin-Ciocalteu es lo último que se añadió a los pocillos, para que el tiempo de reacción fuese lo más parecido posible en todos ellos.

Después, se dejó la reacción transcurrir durante 2 horas en ausencia de luz. Pasado este tiempo, se añadió a todos los pocillos 25 µL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) para parar la reacción. También se añadió a los controles y a los blancos, aunque no llevaran reactivo de Folin. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 725 nm en un lector de microplacas Epoch2 (Biotek), usando el software gen5.

Una vez obtenidas las absorbancias, se llevó a cabo el análisis de datos. Con los datos de la recta patrón obtenidos, se representan las absorbancias en el eje de ordenadas (y) y las concentraciones en el eje de abscisas (x). La línea de tendencia es lineal, $y=ax+b$. Se tuvo en cuenta la dilución de cada pocillo a la hora de representar la concentración de AG en la recta patrón. A todas las absorbancias obtenidas, el software gen5 les resta la absorbancia del blanco (con la opción Blank 725). También se tuvo en cuenta el blanco del extracto, que consiste en la absorbancia del extracto crudo a la concentración que se emplea en la reacción de Folin. Para los cálculos posteriores se restó las absorbancias del blanco de los extractos a las absorbancias de los extractos, así:

$$Abs_{extracto\ real} = abs_{extracto} - abs_{blanco\ extracto} \quad [4]$$

A partir de la absorbancia real del extracto tras la reacción de Folin, se calculó la concentración de ácido gálico equivalente (AGeq) en términos de ppm, despejando la incógnita x de la ecuación obtenida en la recta patrón de AG. Para expresar la concentración de polifenoles por cada 100 µg de extracto, se usó la siguiente ecuación (Eq. 5).

$$\frac{\mu g\ polifenoles}{100\ \mu g\ extracto} = a \frac{\mu g\ AGeq}{mL} \times \frac{250\ \mu L\ totales}{12,5\ \mu L\ extracto} \times \frac{1}{[extracto]} \times 100\ \mu g\ extracto \quad [5]$$

Donde a es la concentración obtenida al interpolar en la recta patrón (despejando x) y la concentración de extracto es 1000 o 2000 ppm.

Por otro lado, también se llevó a cabo la medición de los polifenoles totales en la muestra por **espectrofotometría**, midiendo la absorbancia de las muestras a 280 nm, que es la longitud de onda a la que absorben en mayor medida la mayoría de polifenoles. Para llevar a cabo este ensayo se hizo una recta patrón de AG con disoluciones a 30, 25, 20, 15, 10, 7 y 5 ppm. Para medir la absorbancia de las muestras, se diluyeron a 1:500 o a 1:50. Las medidas se realizaron por duplicado y se calculó la concentración de AGeq con la ecuación obtenida en la recta patrón. Se multiplicó por el factor de dilución (F) para obtener la concentración real en ppm del extracto. Por último, se expresaron los datos en gramos de AGeq por gramos de extracto. Se usó la ecuación expresada a continuación (Eq. 6).

$$[polifenoles] \left(\frac{g\ AGeq}{g\ extracto} \right) = [AGeq] \left(\frac{\mu g}{ml} \right) \times F \times \frac{1}{[extracto] \left(\frac{g\ extracto}{ml} \right)} \times \frac{1\ g}{10^6\ \mu g} \quad [6]$$

6.1.4.2. Análisis del Índice de Actividad Antioxidante (AAI)

Muchos de los polifenoles de los sustratos tienen capacidad antioxidante, como ya se mencionó en la introducción. Para visualizar el cambio de esta capacidad de los sustratos fermentados respecto a los sustratos sin fermentar, se llevó a cabo un ensayo que está basado en la reacción de los antioxidantes con el compuesto 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). El DPPH tiene un radical libre que al estar en contacto con un antioxidante se reduce (figura 8), y su coloración pasa de ser púrpura a amarillenta. Cuando el DPPH tiene el radical libre absorbe a una longitud de onda de 515 nm, sin embargo, cuando está reducido no absorbe dicha longitud de onda.

Para realizar este ensayo, se preparó una disolución madre de DPPH con etanol 96 % a una concentración de $6 \cdot 10^{-4}$ M. Se conservó en el congelador a -20°C , en ausencia de luz. A partir de ésta se preparó la disolución de trabajo, cuya concentración era de $6 \cdot 10^{-5}$ M.

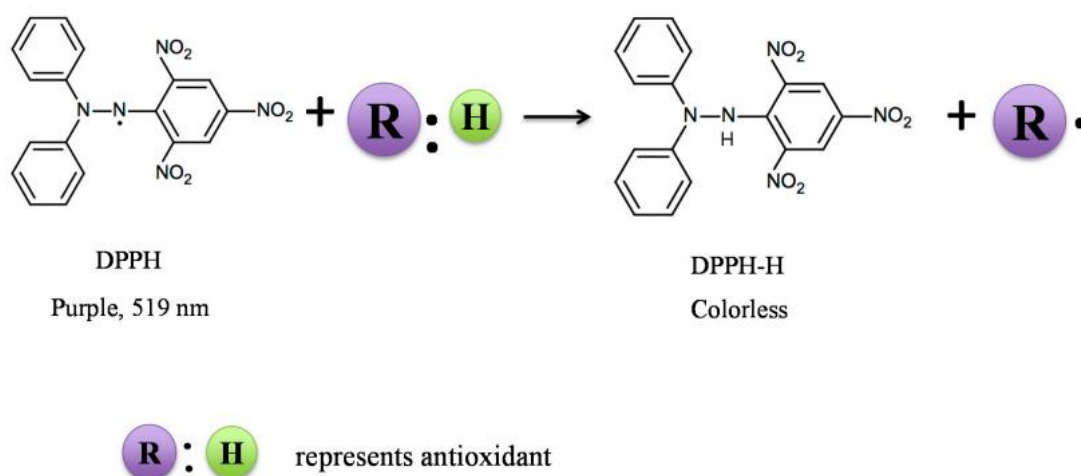


Figura 8. Reacción de oxidación del DPPH en presencia de un antioxidante (Liang & Kitts, 2014).

Para el análisis se usó una placa de 96 pocillos, en la que se midió la absorbancia de las muestras a seis concentraciones distintas: 2000, 1000, 500, 250, 125 y 62,5 ppm. Cada concentración se midió por duplicado. A cada pocillo se le añadían 292,5 μL de DPPH a la concentración de trabajo y 7,5 μL de extracto. A los controles se le añadió 292,5 μL de DPPH y 7,5 μL de etanol y los blancos contenían 300 μL de etanol.

Se midió la absorbancia inicial de los controles en el lector de microplacas Epoch2 (Biotek) con el software "Gen5". Se dejó transcurrir la reacción durante 2 horas en la oscuridad, cubriendo la placa de 96 pocillos con varias capas de papel de aluminio para impedir que la luz degradase el DPPH. Pasado el tiempo de reacción, se midió la absorbancia a 515 nm en el mismo lector de microplacas anteriormente mencionado.

Para calcular la cantidad de DPPH no degradado, se usó la siguiente ecuación (Eq. 7).

$$\%DPPH \text{ remanente} = \frac{\text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia inicial}} \times 100 \quad [7]$$

Después, se representó la concentración del extracto en la reacción respecto al % DPPH remanente, con un ajuste de una curva polinómica de segundo grado. Se calculó la concentración efectiva máxima, EC_{50} , concentración a la cual se reduce el 50 % del DPPH. Para ello, se usa la ecuación polinómica de segundo grado obtenida de la representación anterior, sabiendo que $y=50$.

Una vez conocida EC_{50} , se calculó el AAI con la ecuación 8 (Eq. 8).

$$AAI = \frac{EC_{50}}{[DPPH]_0 \text{ en la reacción}} \quad [8]$$

Siendo la concentración de DPPH inicial en cada pocillo (Eq. 9):

$$[DPPH]_0 = 6 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times \frac{394,32 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{10^6 \mu\text{g}}{1 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ L}}{10^3 \text{ mL}} \times \frac{293 \mu\text{L}}{300 \mu\text{L}} = 23,11 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad [9]$$

La actividad antioxidante fue mayor en las muestras con mayor AAI y con menor EC_{50} .

Los extractos presentan actividad antioxidante baja cuando $AAI < 0,5$, moderada cuando AAI está entre 0,5 – 1,0, actividad antioxidante fuerte cuando el valor del AAI está entre 1,0 – 2,0 y muy fuerte cuando el $AAI > 2$ (Fernández-Ponce et al., 2012).

6.1.5. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un tratamiento estadístico de análisis de la varianza (ANOVA) con el software “Statgraphics Plus 4.0”. Se hizo una comparación de múltiples muestras, en las que se comprobó si la diferencia entre las materias primas sin fermentar y fermentadas con los tres hongos era significativa. Las variables fueron el rendimiento de la extracción, el contenido total de polifenoles (TPC) y el índice de actividad antioxidante (AAI), de las cuales se tenían dos réplicas. Se analizó cada materia prima y cada variable por separado. Se considera que hay diferencias significativas cuando el P-valor es mayor a 0,05. Para conocer los grupos homogéneos se usó la opción “contraste de múltiples rangos”.

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Fermentación en estado sólido (FES)

A continuación, se presentan los resultados obtenidos tras realizar las fermentaciones en estado sólido (FES) con las diferentes materias primas evaluadas: hoja de mango, hoja de olivo, hollejo y cáscaras de naranja dulce y agria. Inicialmente sólo se planteó evaluar el hongo *Aspergillus awamori*, pero finalmente se decidió evaluar diferentes hongos filamentosos, incluyendo

Aspergillus awamori, *Trichoderma reesei* y *Botrytis cinerea* con idea de realizar un screening para determinar el hongo y el tipo de residuo que presentaba resultados con mayor potencial.

Para la fermentación con **A. awamori** tras 24 h de fermentación no se observó crecimiento en ningún residuo (figura 9). A las 48 h (figura 10) el hongo sólo había cubierto la superficie de las placas de hollejo. A las 72 h (figura 11) las de naranja agria también estaban cubiertas, mientras que en las demás había indicios de crecimiento. Por último, a las 120 h (figura 12), todas las placas estaban cubiertas. A continuación, las figuras 9-12 muestran las fermentaciones de los distintos residuos. De izquierda a derecha se encuentran hollejo, hoja de mango, naranja agria, naranja dulce y hoja de olivo, siguiendo todas las imágenes de las fermentaciones este orden.



Figura 9. Fermentación con *A. awamori* a las 24 h.



Figura 10. Fermentación de *A. awamori* a las 48 h.



Figura 11. Fermentación de *A. awamori* a las 72 h.



Figura 12. Fermentación de *A. awamori* a las 120 h.

En la fermentación con *T. reesei* no se observó crecimiento a las 24 h (figura 13) y a las 48 h sólo se observa crecimiento en el hollejo, sin embargo, a las 72 h (figura 14) el hongo había crecido en todos los residuos, menos en la naranja dulce y en una de las placas con naranja agria. Finalmente, a las 120 h (figura 15) el hongo había crecido en todos los residuos menos en la naranja dulce, que había crecido sólo por los bordes y de una forma irregular en cada placa. Se puso una nueva fermentación sólo con naranja dulce, pero tampoco se observó crecimiento tras 120 h de fermentación. Por tanto, no se hicieron extracciones de este residuo y no se presentaron resultados de rendimiento, contenido de polifenoles ni actividad antioxidante para este residuo.



Figura 13. Fermentación con *T. reesei* a las 24 h.



Figura 14. Fermentación con *T. reesei* a las 72 h.



Figura 15. Fermentación con *T. reesei* a las 120 h.

En la fermentación con *B. cinerea*, el crecimiento se empezó a observar tras 48 h de fermentación, tal como se observó con los otros hongos estudiados (figura 17). A las 48 h había crecimiento en el hollejo, que estaba cubierto de una capa blanca, y en el mango y olivo se observaban micelios, mientras que la naranja agria tenía crecimiento sólo por los bordes. A las 72 h (figura 18), la capa blanca del hollejo empezó a oscurecerse, el mango y el olivo presentaban mayor crecimiento, en la naranja agria se notaba un leve crecimiento y en la naranja dulce iniciaba el crecimiento por los bordes de la placa. A las 120 h (figura 19), había crecido por igual en el hollejo, el olivo, el mango y la naranja dulce. Al igual que en la anterior fermentación, el hongo creció de forma desigual en la naranja dulce, por lo que tampoco se extrajo ni se analizó su extracto.

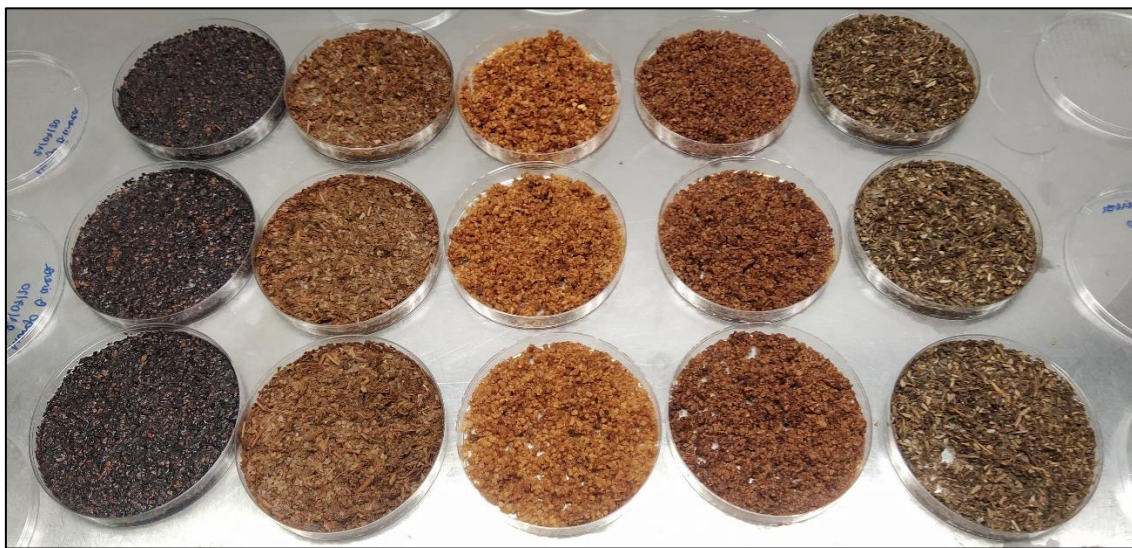


Figura 16. Fermentación con *B. cinerea* a las 24 h.



Figura 17. Fermentación con *B. cinerea* a las 48 h.



Figura 18. Fermentación con *B. cinerea* a las 72 h.

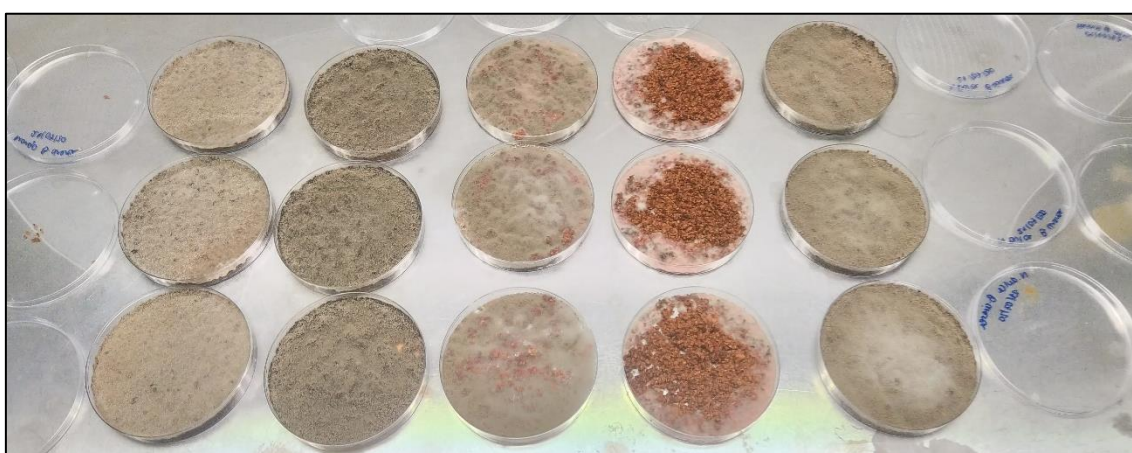


Figura 19. Fermentación con *B. cinerea* a las 120 h.

En general, las tres fermentaciones tuvieron un desarrollo similar. El primer residuo en crecer siempre fue el hollejo y el último, la naranja dulce. Con *B. cinerea* se observó un crecimiento más rápido en las hojas de mango y de olivo, respecto a lo que se vio en los otros dos hongos. Las réplicas de los residuos solían crecer de manera homogénea en las hojas de mango, de olivo y en el hollejo, pero sí se notó diferencia entre las réplicas de naranja agria y dulce.

6.2.2. Extracción de compuestos polifenólicos

6.2.2.1. Resultados de la Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)

Con la SFE se obtuvieron unos rendimientos bajos: 5-10 % en las hojas de mango y olivo, hollejo y cáscaras de naranja alrededor de un 4 %. Con el fin de mejorar el rendimiento, se propone estudiar otras técnicas de alta presión. En el estudio de Espinosa-Pardo et al. se reporta el uso de la PLE como una buena alternativa para la extracción de polifenoles (Espinosa-Pardo et al., 2017).

6.2.2.2. Resultados de la Extracción con Líquidos Presurizados (PLE)

Con la PLE los rendimientos de extracción fueron más altos que con la SFE: 10-20 % con mango, 15-20 % con olivo y 7-10 % con hollejo y más cercanos a los obtenidos con la UAE. Sin embargo, este método emplea mayores tiempos de extracción (hasta 12 h) y volúmenes de disolvente. Por estos motivos, y dado el número elevado de muestras a procesar, se decidió evaluar una tecnología de extracción alternativa a las técnicas de alta presión como es la UAE para la extracción de los residuos tras la FES.

6.2.2.3. Resultados de la Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE)

La evaluación de la técnica UAE permitió rendimientos de extracción satisfactorios y tiempos de extracción cortos (1 h) que facilitan el procesamiento de las muestras. Teniendo en cuenta las ventajas de la UAE, tras el proceso de fermentación se llevaron a cabo las extracciones de los diferentes residuos estudiados mediante la técnica de extracción por ultrasonido, al igual que se hizo con los residuos sin fermentar. Se llevaron a cabo un total de 38 extracciones. El color de los extractos variaba dependiendo del hongo empleado respecto a las materias primas sin fermentar. Esta variación de color está relacionada con la concentración de esporas, el peso de las células y con la actividad enzimática del hongo (Manan & Webb, 2018). Las figuras 20-24 muestran los extractos obtenidos a partir de las distintas materias primas estudiadas. El orden de todas las fotos es, de izquierda a derecha, sustrato sin fermentar, sustrato fermentado con *A. awamori*, sustrato fermentado con *T. reesei* y sustrato fermentado con *B. cinerea*.



Figura 20. Extractos de hoja de mango.



Figura 21. Extractos de hollejo de uva tinta.

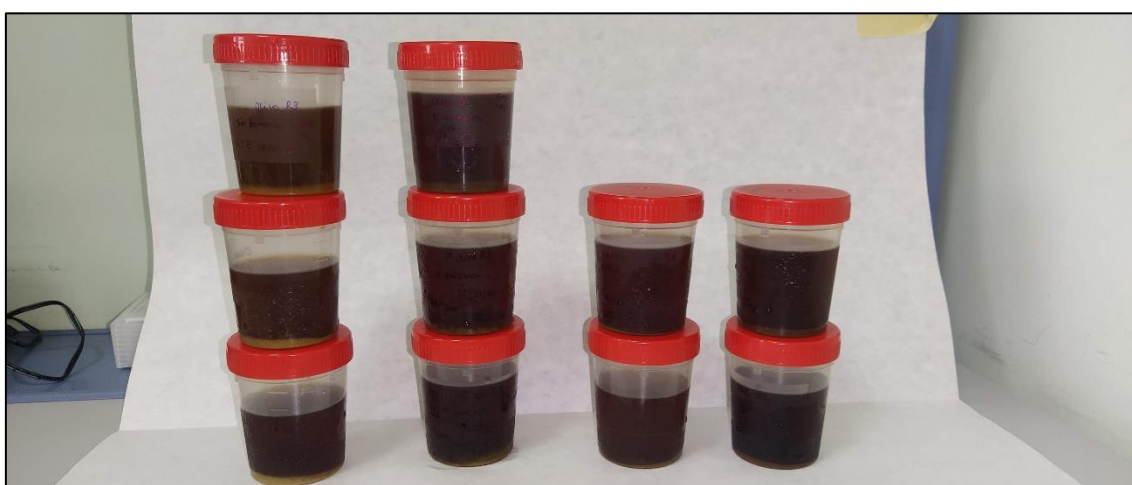


Figura 22. Extractos de hoja de olivo.



Figura 23. Extractos de cáscara de naranja dulce.



Figura 24. Extractos de cáscara de naranja agria.

6.2.2.4. Estudio del rendimiento de la extracción

Tras llevar a cabo el proceso de extracción se realizó el cálculo del rendimiento global de extracción. Los datos de rendimiento de extracción de los residuos sin fermentar y tras la fermentación con los diferentes hongos se presentan en la figura 25.

Los estudios del rendimiento de la extracción después de la fermentación en estado sólido son muy escasos, por lo que no se encontró ningún estudio con el que contrastar los resultados obtenidos.

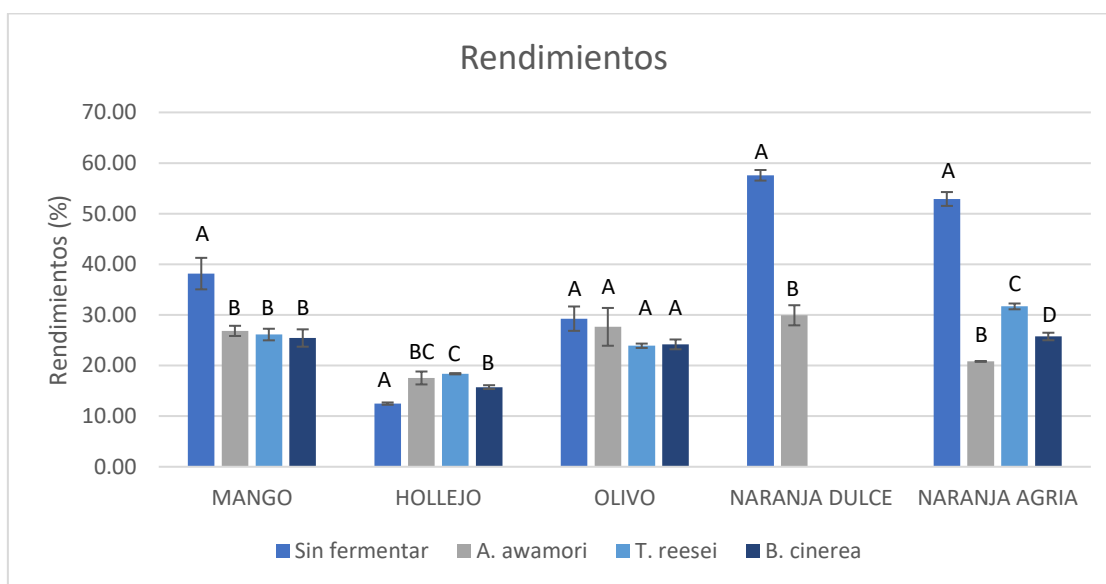


Figura 25. Comparación de los rendimientos de extracción para los diferentes residuos y hongos evaluados. Las letras indican los grupos homogéneos con un nivel de confianza del 95% (P-valor <0,05).

En la figura 25 se observa que el rendimiento del **hollejo** aumentó en los extractos fermentados. Esto se debe a que después de la fermentación las paredes de las células vegetales están debilitadas y es más fácil la extracción de compuestos de su interior. El mayor rendimiento se observó en el hollejo fermentado con *T. reesei*.

Por el contrario, el rendimiento de las demás materias primas disminuyó y de manera más acusada en las hojas de **mango** y las cáscaras de **naranja dulce y agria** (figura 24). En el caso de las cáscaras de naranja esto es debido a que el disolvente usado tiene una parte de agua y extrae las pectinas presentes de forma natural en la naranja. El hongo produce enzimas pectinólitas para poder metabolizar dicho polisacárido, solubilizándose, de ahí que se obtenga una menor cantidad de extracto (Couto & Sanromán, 2006; Singh Nee Nigam & Pandey, 2009). Esto se puede apreciar visualmente en los extractos fermentados, que presentaron una menor viscosidad en comparación con los extractos sin fermentar debido a que estos últimos tienen una mayor cantidad de pectina. Por este motivo, en los extractos de las cáscaras fermentadas no se forma ese gel y su rendimiento baja de forma drástica hasta la mitad. En el caso de la hoja de mango y **olivo** es posible que también el hongo consuma algún tipo de polisacárido presente en este residuo y por tanto disminuya el rendimiento de extracción tras la fermentación.

Por tanto, los mayores rendimientos fueron obtenidos por las cáscaras de naranja sin fermentar, por el hecho de la extracción conjunta de pectina al emplear una mezcla hidroalcohólica como disolvente. A continuación, la hoja de mango sin fermentar proporcionó un rendimiento considerable, alrededor de un 40 %, seguida de la hoja de olivo sin fermentar con rendimientos cercanos al 30 %. El hollejo fue el único residuo evaluado que proporcionó menores rendimientos de extracción, cercanos al 20 %, que el mismo residuo fermentado. La fermentación en la que más aumentó el rendimiento de extracción fue la de hollejo con *T. reesei*, pasando del 12,48 % al 18,38 %, lo que corresponde un incremento del 5,90 % en el rendimiento.

En cuanto al análisis estadístico realizado se analizó cada residuo por separado y se realizó una comparación de múltiples muestras, en las que se comprobó si la diferencia entre las materias primas sin fermentar y fermentadas con los tres hongos era significativa. En el caso de las hojas de mango obtuvieron un P-valor de 0,0075, lo que indica que al menos uno de los grupos homogéneos es significativamente diferente con un nivel de confianza del 95 %. Se observa, por tanto, una diferencia significativa entre el residuo sin fermentar y el residuo fermentado indistintamente del hongo empleado, siendo el grupo diferente las hojas de mango sin fermentar (SF), como se puede observar en la figura 25.

Para el hollejo, se obtuvo un P-valor de 0,0034, existiendo un total de tres grupos. El hollejo sin fermentar pertenecía al grupo A, el fermentado con *B. cinerea* al grupo B, el fermentado con *A. awamori* al grupo BC y el fermentado con *T. reesei* al grupo C. En este caso también se observa que el grupo A correspondiente al hollejo sin fermentar es significativamente diferente de los grupos que sufrieron una fermentación. Lo que indica que el proceso de FES favorece el

incremento del rendimiento de extracción de manera estadísticamente significativa (P -valor < 0,05).

En el rendimiento del olivo se obtuvo un P -valor de 0,1840, por lo que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos evaluados a un 95,0 %. Por tanto, la FES no ocasiona cambios en los rendimientos de extracción de este residuo.

Para la cáscara naranja dulce, el P -valor obtenido fue de 0,0033 y, como se puede observar en la figura 25, la diferencia entre ambos extractos, sin fermentar y fermentado con *A. awamori*, fue significativa.

Por último, para la cáscara de naranja agria se obtuvo un P -valor de 0,0000 y cuatro grupos homogéneos por lo que las diferencias en los rendimientos de los extractos para los diferentes tratamientos evaluados fueron significativas. Cada extracto pertenecía a un grupo distinto.

6.2.3. Estudio de la concentración de polifenoles (TPC)

Para la determinación del contenido de polifenoles en los extractos se empleó el método de Folin-Ciocalteu y espectrofotométrico. Con el método Folin-Ciocalteu, los resultados obtenidos no fueron fiables. Las desviaciones estándar tenían unos valores altos e incluso había grandes diferencias entre la misma muestra. Esto puede deberse a interferencias creadas por factores como la naturaleza del disolvente, el pH de la muestra o la presencia de otros compuestos que absorben a la misma longitud de onda a la que se mide el TPC (Brenes et al., 2016). Además, los extractos de los sólidos fermentados podrían presentar compuestos procedentes de las células fúngicas, que probablemente interferían en la reacción.

Por estas razones se usó un segundo método, la medida del TPC mediante espectrofotometría a 280 nm. La recta patrón obtenida, empleando como patrón ácido gálico, se representa en la figura 26 y la concentración de polifenoles con su desviación estándar en la figura 27.

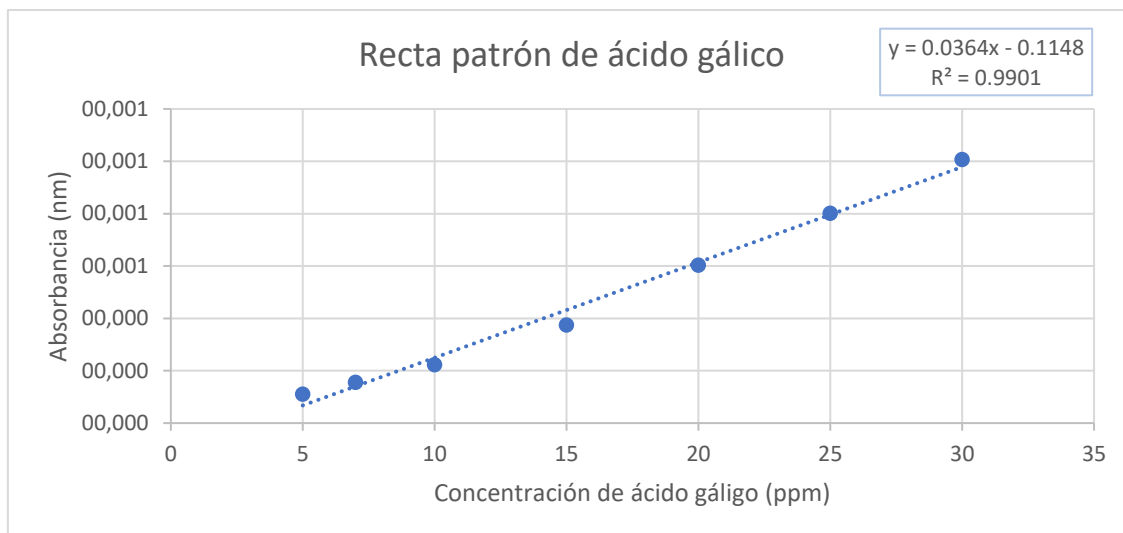


Figura 26. Recta patrón de AG con espectrofotometría.

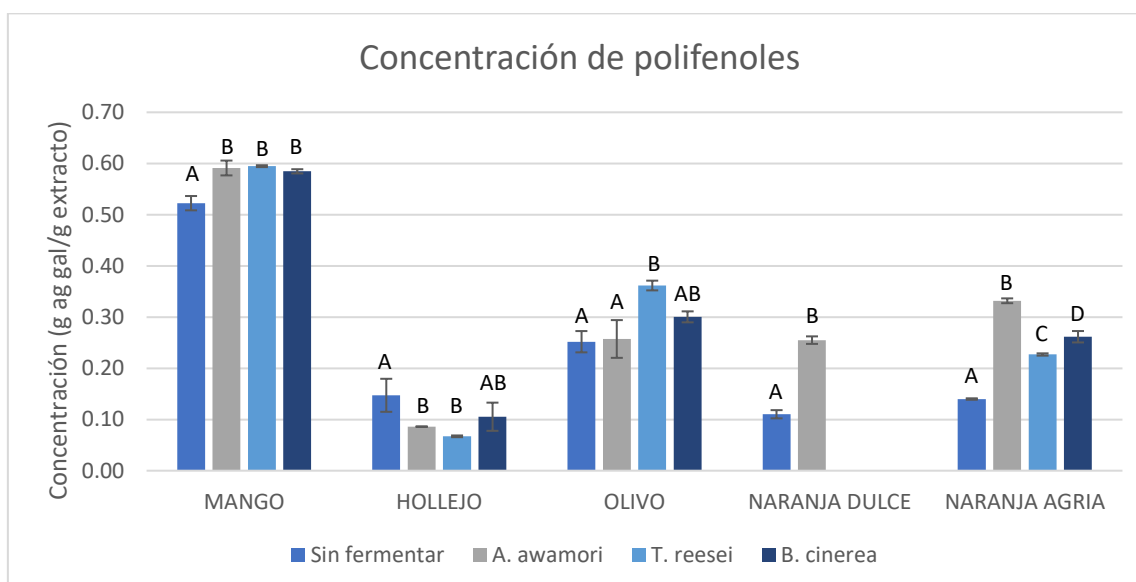


Figura 27. Concentración de polifenoles en todos los sustratos. Las letras indican los grupos homogéneos con un nivel de confianza del 95 % (P-valor<0,05).

En la figura 27 se observa que la fermentación en estado sólido aumenta la concentración de polifenoles obtenidos a partir de las materias primas estudiadas, excepto en el hollejo de uva tinta.

En las hojas de **mango** se observó un incremento de la concentración de polifenoles después de las fermentaciones con todos los hongos estudiados, determinándose un incremento del 0,52 g AGeq/ g extracto a valores cercanos a 0,6 g AGeq/ g extracto con los tres hongos empleados sin observarse diferencias significativas entre ellos. El análisis estadístico confirmó que las diferencias entre los extractos sin fermentar y los fermentados son significativas, obteniendo un P-valor de 0,0061. Esto se puede apreciar en la figura 28, en la que se muestra el gráfico de cajas y bigotes obtenido en el análisis estadístico.

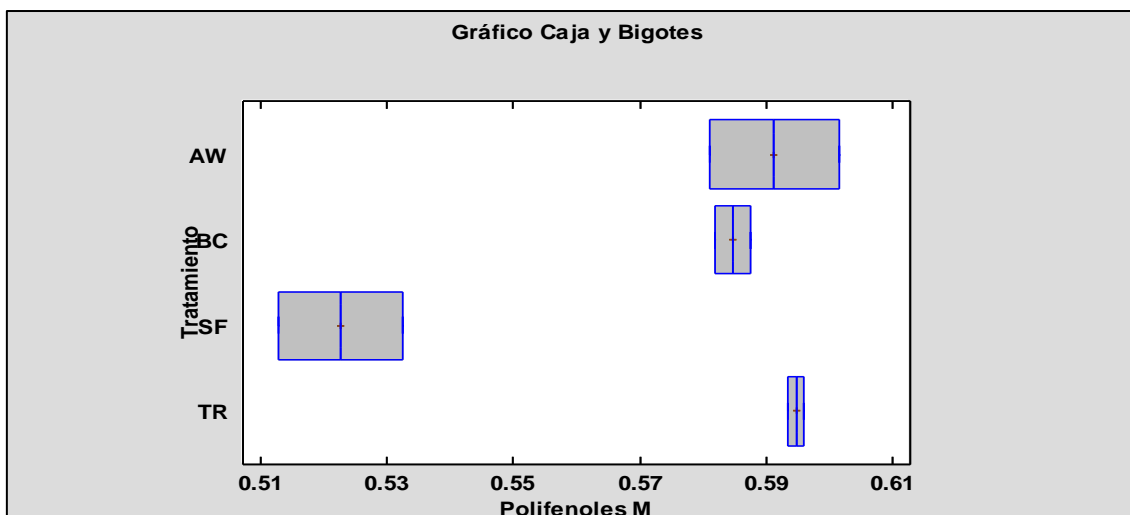


Figura 28. Gráfico de cajas y bigotes para los polifenoles en las hojas de mango. SF se refiere a “sin fermentar”, AW a “*A. awamori*”, TR a “*T. reesei*” y BC a “*B. cinerea*”.

En el **hollejo**, ninguna fermentación mejoró la concentración de polifenoles presente en el extracto sin fermentar. El P-valor obtenido fue de 0,072 que, aunque los extractos no perteneciesen al mismo grupo homogéneo, indicó que las diferencias no fueron significativas ya que es mayor de 0,05. Se representa la gráfica obtenida en la figura 29.

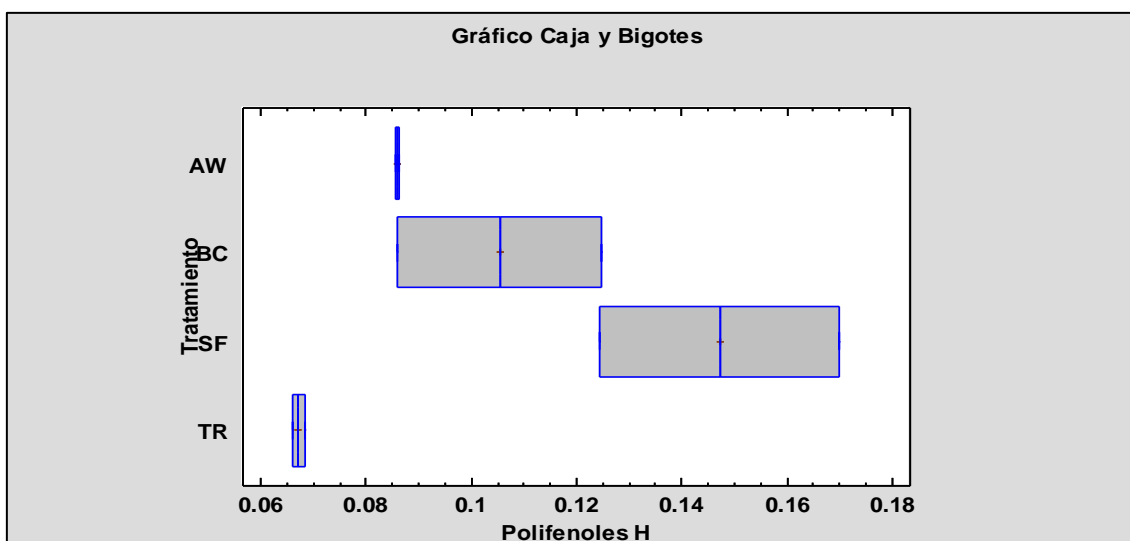


Figura 29. Gráfico de cajas y bigotes para los polifenoles en el hollejo de uva tinta. SF se refiere a “sin fermentar”, AW a “*A. awamori*”, TR a “*T. reesei*” y BC a “*B. cinerea*”.

En las hojas de **olivo**, la concentración de polifenoles se mantuvo cuando se fermentó con *A. awamori*. Se observa un incremento mayor empleando *T. reesei*, aumentando de 0,25 g AGeq/g extracto sin fermentar a 0,36 de extracto fermentado, siendo este aumento significativo. El P-valor obtenido en el análisis estadístico fue 0,0237, por lo que se puede afirmar que al menos uno de los grupos es significativamente diferente con un nivel de confianza del 95 %. Se obtuvieron 2 grupos, siendo el extracto sin fermentar y el fermentado con *A. awamori* uno de

ellos, el fermentado con *T. reesei* otro y el extracto fermentado con *B. cinerea* pertenecía a ambos grupos. El gráfico de cajas y bigotes se representa en la figura 30, donde se observan los grupos homogéneos mencionados anteriormente.

En un estudio de Contreras et al. se obtuvieron 0,141 g AGEq/ g extracto obtenido tras extraer con ultrasonidos hojas de olivo sin fermentar, valor muy inferior a los obtenidos en este trabajo. Para la extracción se usó un baño de ultrasonidos de 40kHz a diferencia del usado en este TFG, que era de 50 kHz. Se reportó que las mejores condiciones para la extracción de polifenoles eran 50 min y una mezcla de etanol-agua al 47 % (Contreras et al., 2020).

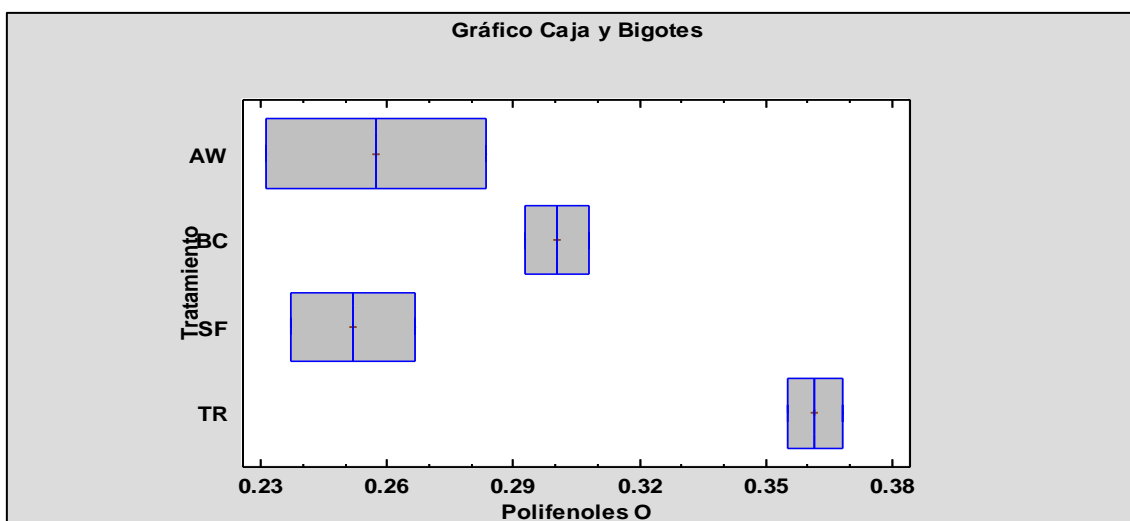


Figura 30. Gráfico de cajas y bigotes para los polifenoles en las hojas de olivo. SF se refiere a “sin fermentar”, AW a “*A. awamori*”, TR a “*T. reesei*” y BC a “*B. cinerea*”.

En cuanto a la **naranja dulce**, se observa un aumento de más del doble en la concentración de polifenoles después de ser fermentado con *A. awamori* con incremento de 0,11 g AGEq/ g extracto sin fermentar a 0,26 g AGEq/ g extracto fermentado. El P-valor obtenido en el análisis estadístico fue 0,0028, lo que indicó que esta diferencia es significativa.

En la bibliografía se recoge un estudio en el que se lleva a cabo la extracción de cáscara de naranja con CO₂ supercrítico obteniendo un TPC de 0,0180 – 0,0218 g AGEq/g extracto después de la fermentación con el hongo *Paecilomyces variotii* (Espinosa-Pardo et al., 2017). Estas concentraciones son muy inferiores a las obtenidas con la extracción asistida por ultrasonido en el presente trabajo. También se ha descrito en otro trabajo un pequeño aumento de la concentración de polifenoles después de la FES con *Paelomyces variotii* sobre la cáscara de naranja, pasando de 0,54 a 0,57 g AGEq/ ml extracto (El-Katony et al., 2020).

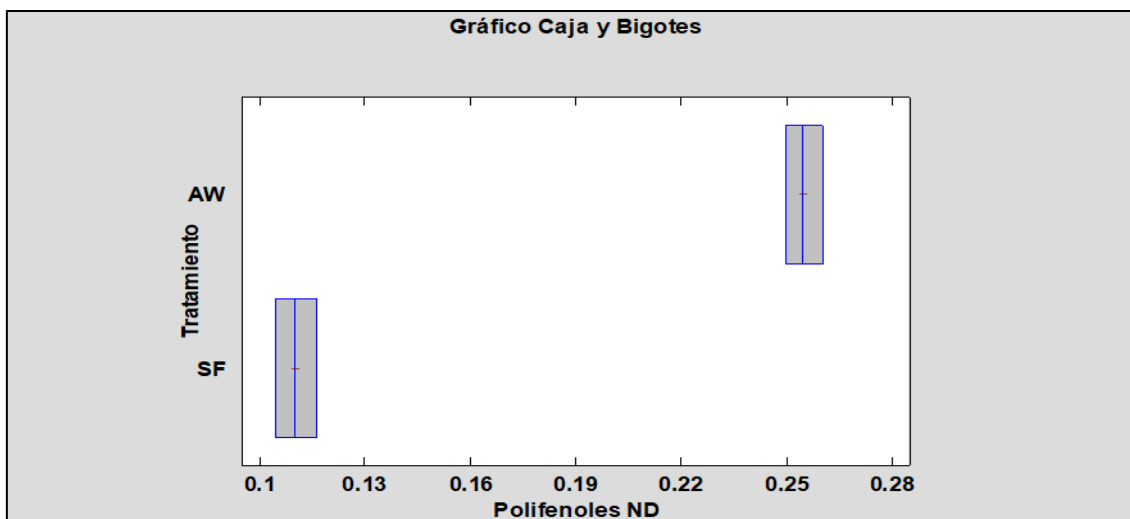


Figura 31. Gráfico de cajas y bigotes para los polifenoles en la cáscara de naranja dulce. SF se refiere a “sin fermentar”, AW a “*A. awamori*”, TR a “*T. reesei*” y BC a “*B. cinerea*”.

En el caso de la **naranja agria**, también se duplica la concentración de polifenoles pasando de 0,14 a 0,33 g AGEq/ g extracto al fermentarse con *A. awamori*. Los hongos *T. reesei* y *B. cinerea* también favorecieron la concentración de polifenoles, pero de manera menos acusada que el observado con *A. awamori*. En el análisis estadístico se obtuvo un P-valor de 0,0000 y cada extracto perteneció a un grupo homogéneo distinto. Esto indicó que existen diferencias significativas entre los extractos fermentados respecto al extracto sin fermentar, efecto que también se observa en el gráfico de cajas y bigotes (figura 32).

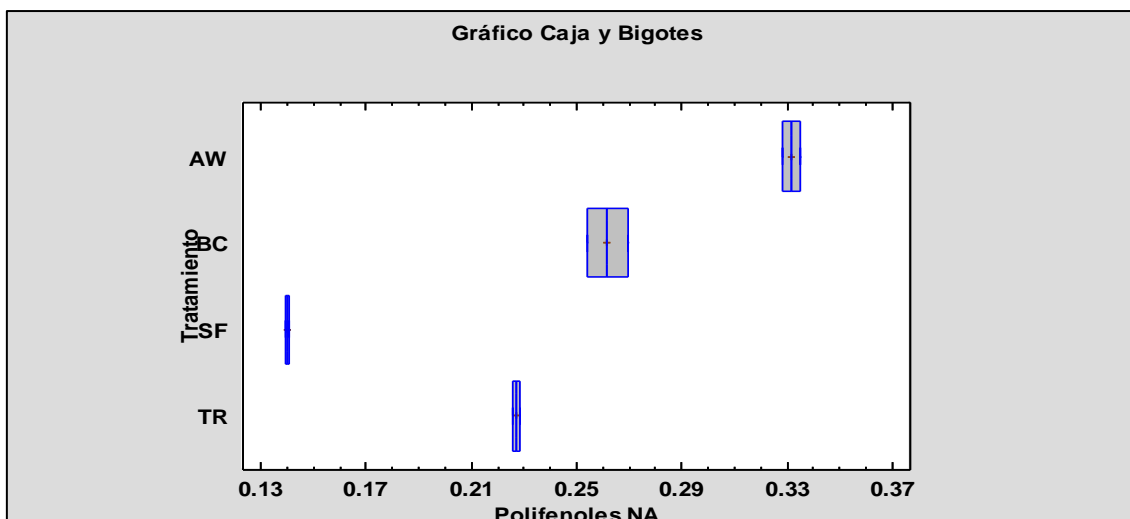


Figura 32. Gráfico de cajas y bigotes para los polifenoles en la cáscara de naranja agria. SF se refiere a “sin fermentar”, AW a “*A. awamori*”, TR a “*T. reesei*” y BC a “*B. cinerea*”.

Por último, en la figura 26 se representaron todas las concentraciones obtenidas y se observó que el sustrato con mayor cantidad de polifenoles es el mango fermentado y la FES incrementa de manera significativa el contenido de polifenoles. Sin embargo, las fermentaciones en las que

más aumentó la concentración de polifenoles tras la FES fueron aquellas llevadas a cabo con las cáscaras de naranja, destacando las fermentaciones de naranja agria con *A. awamori* en las que se observó un incremento del doble la concentración de polifenoles y obteniéndose un extracto de mayor calidad.

6.2.4. Estudio de la actividad antioxidante (AAI)

Después de los ensayos de DPPH se obtuvieron los siguientes datos del Índice de Actividad Antioxidante (AAI), mostrados con sus desviaciones estándar en la figura 33.

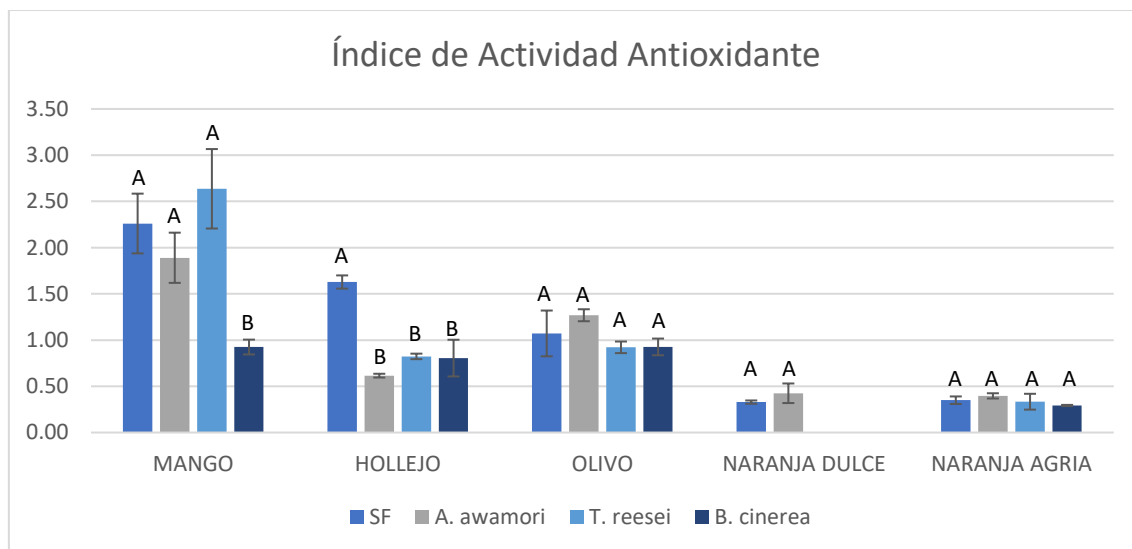


Figura 33. AAI de los extractos.

En la figura 33 se observa claramente que el AAI de las hojas de **mango** es mayor al de los demás sustratos. Se observó que este parámetro disminuyó drásticamente al fermentar el residuo con *B. cinerea*. El análisis estadístico corroboró que esta disminución de la actividad es significativa con un P-valor de 0,0191, siendo este grupo diferente de los otros grupos evaluados. Las fermentaciones con *A. awamori* y *T. reesei* no mostraron diferencias significativas con el residuo sin fermentar, perteneciendo al mismo grupo. La drástica disminución de la actividad antioxidante que se observa en la fermentación con *B. cinerea* se debe a que la actividad antioxidante de un extracto crudo está influenciada por los efectos sinérgicos y antagónicos de los compuestos extraídos. El término de efecto sinérgico se aplica a la sinergia de potenciación mientras que el concepto contrario a la sinergia es el antagonismo. La fermentación de las hojas de mango con este hongo debió favorecer la extracción de compuestos que, por efectos antagónicos, disminuyen considerablemente la actividad del extracto. Por otra parte, comparando la actividad antioxidante de las hojas de mango con otros métodos de extracción, estudios previos han reportado que por el método de extracción con líquidos presurizados y

etanol como co-disolvente se ha llegado a obtener una actividad antioxidante de 5,64 μg DPPH/ μg extracto sin fermentar, siendo más eficiente que la UAE (Fernández-Ponce et al., 2015).

En el **hollejo** se observó el mismo comportamiento que en la concentración de polifenoles. Si la concentración de los polifenoles después de las fermentaciones bajó, cabía esperar que la capacidad antioxidante también disminuyera. En el análisis estadístico, el P-valor obtenido fue 0,0027 y se diferenció el extracto sin fermentar de los fermentados.

En las hojas de **olivo**, aunque la concentración de polifenoles fuese más alta, el AAI no aumentó. Esta diferencia tampoco fue significativa, ya que el P-valor obtenido fue de 0,1728.

La actividad antioxidante de las cáscaras de **naranja dulce y agria** es bastante baja y no se logró un incremento de dicha actividad tras la fermentación a pesar de que sí se observó un incremento en el contenido de polifenoles. En este caso, los compuestos extraídos tras la fermentación presentaron un efecto antagónico que conllevó a la disminución de la actividad antioxidante de los extractos. Este efecto antagónico también se observó de manera más acusada en el hollejo fermentado con los tres hongos evaluados y en las hojas de olivo con *T. reesei* y *B. cinerea*. En ambas materias primas, el P-valor superó 0,05, por lo que las diferencias en la actividad antioxidante no fueron significativas.

En un estudio que aparece publicado en la literatura, en el cual se lleva a cabo la FES con *Pleurotus floridanus*, *Aspergillus fumigatus* y *Paelomyces variotii*, se ha comprobado que la actividad antioxidante aumenta en la cáscara de naranja dulce. Las extracciones en dicho artículo se realizaron con etanol en un agitador rotatorio, por lo que es probable que no se hayan extraído los mismos compuestos (El-Katony et al., 2020).

Comparando todos los residuos, los extractos con mayor actividad antioxidante son los obtenidos a partir de hojas de mango con un valor de AAI mayor de 2, que corresponde a una potente actividad antioxidante. Por el contrario, los extractos que tienen menor actividad antioxidante son las cáscaras de naranja, cuyo valor está por debajo de 0,5 μg DPPH/ μg extracto. El hollejo sin fermentar tiene mayor AAI que las hojas de olivo fermentadas y sin fermentar. Sin embargo, se observó que ninguna actividad antioxidante mejoró significativamente después de las fermentaciones debido a posibles efectos antagónicos entre los compuestos extraídos.

7. CONCLUSIONES

Habiendo discutido previamente los resultados experimentales, se llega a las siguientes conclusiones:

1. El proceso de fermentación en estado sólido deja más accesible los polifenoles presentes en cuatro de los residuos estudiados (mango, olivo, naranja agria y naranja dulce). En dichos residuos se observa un crecimiento de la concentración de polifenoles cuando el residuo está fermentado respecto al residuo sin fermentar, y de manera más acusada en las cáscaras de naranja.
2. Entre los distintos métodos evaluados, la extracción asistida por ultrasonido ofrece ventajas para la extracción de polifenoles. Se consigue un mayor rendimiento que con la extracción con CO₂ supercrítico y es mucho más rápida que la extracción con líquidos presurizados, además de emplear pequeños volúmenes de disolventes y no utilizar altas temperaturas que puedan degradar los polifenoles.
3. Las hojas de mango son el residuo con mayor concentración de polifenoles (>0,50 AGeq/g extracto) y actividad antioxidante (IAA > 2), tanto fermentado como sin fermentar.
4. Las cáscaras de naranja agria fermentada con *A. awamori* duplicó la cantidad de polifenoles presentes en la cáscara sin fermentar, pasando de 0,14 a 0,33 g AGeq/g extracto.
5. El proceso de FES no favoreció la mejora de la actividad antioxidante de los residuos evaluados, a pesar de que en algunos casos se observó un incremento del contenido de polifenoles. El proceso FES posiblemente favorece la disponibilidad y extracción de compuestos que por efectos antagónicos ocasionan una disminución de la actividad antioxidante.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los residuos agroalimentarios en crecimiento no deben considerarse desechos, sino materias primas renovables y respetuosas con el medio ambiente de las cuales se pueden obtener numerosos compuestos de valor añadido. El uso de nuevas tecnologías verdes como la extracción con fluidos supercríticos o la extracción asistida por ultrasonido ha de fomentarse debido a la necesidad de ahorrar agua, disolventes y tiempo.

Este Trabajo de Fin de Grado permitió evaluar el potencial la fermentación en estado sólido, empleando diferentes hongos filamentosos sobre diferentes residuos, para mejorar la recuperación de polifenoles. Sin embargo, para mejorar los resultados obtenidos es necesario realizar más estudios en los que se optimicen las condiciones de fermentación y las de extracción. Así, en la fermentación se podría analizar el efecto de otras variables como el número de células inoculadas, el tamaño de partícula de la materia prima, el porcentaje de humedad usado y el tiempo en el que se lleva a cabo la fermentación. También sería necesario estudiar el mejor método para la extracción de polifenoles, evaluando, además, parámetros como la temperatura, el tiempo y el disolvente usado. Por último, es importante que estas condiciones fueran probadas para cada materia prima, aprovechando al máximo su potencial.

Cuando el proceso esté optimizado probablemente sea una vía interesante, económica y ecológica para obtener sustancias bioactivas revalorizando a los residuos agroalimentarios tras el proceso de fermentación.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ayuda, M. I., Esteban, E., Martín-Retortillo, M., & Pinilla, V. (2020). The blue water footprint of the Spanish wine industry: 1935-2015. *Water (Switzerland)*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/w12071872>
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A., & Balsano, C. (2014). Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18508–18524. <https://doi.org/10.3390/ijms151018508>
- Bellon-Maurel, V., Orliac, O., & Christen, P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: A review. *Process Biochemistry*, 38(6), 881–896. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00093-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00093-6)
- Berbel, J., & Posadillo, A. (2018). Review and analysis of alternatives for the valorisation of agro-industrial olive oil by-products. *Sustainability (Switzerland)*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.3390/su10010237>
- Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, 68, 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>
- Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., & Chemat, F. (2015). Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.11.015>
- Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., & Arija, I. (2016). Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016>
- Contreras, M. del M., Lama-Muñoz, A., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., & Castro, E. (2020). Valorization of olive mill leaves through ultrasound-assisted extraction. *Food Chemistry*, 314(January), 126218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126218>
- Couto, S. R., & Sanromán, M. Á. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>

- Cravotto, G., Mariatti, F., Gunjevic, V., Secondo, M., Villa, M., Parolin, J., & Cavaglià, G. (2018). Pilot scale cavitation reactors and other enabling technologies to design the industrial recovery of polyphenols from agro-food by-products, a technical and economical overview. *Foods*, 7(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/foods7090130>
- Cruz, M. (2016). *Desarrollo de un proceso de fermentación sólida para el hongo Trichoderma asperellum Th204 en un fermentador de lecho fijo. August 2014.* <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3463.0001>
- Díaz, A., Alvarado, O., de Ory, I., Caro, I., & Blandino, A. (2013). Valorization of grape pomace and orange peels : Improved production of hydrolytic enzymes for the clarification of orange juice. *Elsevier*.
- Díaz, A. B., Blandino, A., Webb, C., & Caro, I. (2016). Modelling of different enzyme productions by solid-state fermentation on several agro-industrial residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(22), 9555–9566. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7629-y>
- Díaz, A. B., Caro, I., de Ory, I., & Blandino, A. (2007). Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.006>
- Díaz Sánchez, A. B. (2009). Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial. *Tesis Doctoral*, 382.
- Dosoky, N. S., & Setzer, W. N. (2018). Biological activities and safety of citrus spp. Essential oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms19071966>
- Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35(June 2019), 100547. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547>
- El-Katony, T. M., Nour El-Dein, M. M., El-Fallal, A. A., Ibrahim, N. G., & Mousa, M. M. (2020). Substrate–fungus interaction on the enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities of solid state fermentation system. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00316-8>
- Espinosa-Pardo, F. A., Nakajima, V. M., Macedo, G. A., Macedo, J. A., & Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds from dry and fermented orange pomace using

- supercritical CO₂ and cosolvents. *Food and Bioproducts Processing*, 101, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.10.002>
- Farag, M. A., Abib, B., Ayad, L., & Khattab, A. R. (2020). Sweet and bitter oranges: An updated comparative review of their bioactives, nutrition, food quality, therapeutic merits and biowaste valorization practices. *Food Chemistry*, 331(May), 127306.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127306>
- Fernández-Ponce, M. Teresa, Casas, L., Mantell, C., & De La Ossa, E. J. M. (2013). Potential Use of mango leaves extracts obtained by high pressure technologies in cosmetic, pharmaceuticals and food industries. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 1147–1152.
<https://doi.org/10.3303/CET1332192>
- Fernández-Ponce, M. Teresa, Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., & Martínez De La Ossa, E. (2012). Extraction of antioxidant compounds from different varieties of *Mangifera indica* leaves using green technologies. *Journal of Supercritical Fluids*, 72, 168–175.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.07.016>
- Fernández-Ponce, Ma Teresa, Casas, L., Mantell, C., & De La Ossa, E. M. (2015). Use of high pressure techniques to produce *Mangifera indica* L. leaf extracts enriched in potent antioxidant phenolic compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.04.006>
- Fernández-Ponce, Ma Teresa, Casas, L., Mantell, C., & Martínez De La Ossa, E. (2014). Fractionation of *Mangifera indica* Linn polyphenols by reverse phase supercritical fluid chromatography (RP-SFC) at pilot plant scale. *Journal of Supercritical Fluids*, 95, 444–456.
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.10.005>
- Fomo, G., Madzimbamuto, T. N., & Ojumu, T. V. (2020). Applications of nonconventional green extraction technologies in process industries: Challenges, limitations and perspectives. *Sustainability (Switzerland)*, 12(13), 1–21. <https://doi.org/10.3390/su12135244>
- Friedman, M. (2014). Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26), 6025–6042. <https://doi.org/10.1021/jf501266s>
- Gaınd, S. (2017). Exploitation of Orange Peel for Fungal Solubilization of Rock Phosphate by Solid State Fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1351–1360.
<https://doi.org/10.1007/s12649-016-9682-2>
- Getachew, A. T., Jacobsen, C., & Holdt, S. L. (2020). Emerging Technologies for the Extraction of

- Marine Phenolics: Opportunities and Challenges. *Marine Drugs*, 18(8), 1–22.
<https://doi.org/10.3390/md18080389>
- Gómez-Brandón, M., Lores, M., Insam, H., & Domínguez, J. (2019). Strategies for recycling and valorization of grape marc. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(4), 437–450.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1555514>
- Guinda, Á. (2006). Use of solid residue from the olive industry. *Grasas y Aceites*, 57(1), 107–115.
<https://doi.org/10.3989/gya.2006.v57.i1.26>
- Jhaumeer Laulloo, S., Bhowon, M. G., Soyfoo, S., & Chua, L. S. (2018). Nutritional and Biological Evaluation of Leaves of *Mangifera indica* from Mauritius. *Journal of Chemistry*, 2018.
<https://doi.org/10.1155/2018/6869294>
- Kalli, E., Lappa, I., Bouchagier, P., Tarantilis, P. A., & Skotti, E. (2018). Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1).
<https://doi.org/10.1186/s40643-018-0232-6>
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Larussa, T., Imeneo, M., & Lizza, F. (2019). Olive tree biophenols in inflammatory bowel disease: When bitter is better. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6).
<https://doi.org/10.3390/ijms20061390>
- Leite, P., Silva, C., Salgado, J. M., & Belo, I. (2019). Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Industrial Crops and Products*, 137(March), 315–322.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.044>
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules*, 19(11), 19180–19208.
<https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
- M. A., E. U.-G., A.B., D., I., de O., A., B., & Gomes. (2011). *Xylanase production by Aspergillus awamori under solid state fermentation conditions on tomato pomace*. 000, 1585–1597.
- Manan, M. A., & Webb, C. (2018). Colour changes as an indicator for estimating fungal growth in solid state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 14(4), 254–264.
- Martin, M., & He, Q. (2009). Mango bioactive compounds and related nutraceutical properties-

- A review. *Food Reviews International*, 25(4), 346–370.
<https://doi.org/10.1080/87559120903153524>
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365–373.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008>
- Marzo, C., Díaz, A. B., Caro, I., & Blandino, A. (2019). Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Management and Research*, 37(2), 149–156. <https://doi.org/10.1177/0734242X18798699>
- Masutti, D. C., Scardovi, F., Borgognone, A., & Setti, L. (2016). Agro-food wastes for the release of phyto-chemicals and the production of enzymes by solid state fermentation using pleurotus ostreatus. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 139–144.
<https://doi.org/10.3303/CET1649024>
- Meini, M. R., Cabezudo, I., Boschetti, C. E., & Romanini, D. (2019). Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process. *Food Chemistry*, 283(December 2018), 257–264.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.037>
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. In *Polyphenols in Plants* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00025-6>
- Orzua, M. C., Mussatto, S. I., Contreras-Esquivel, J. C., Rodriguez, R., de la Garza, H., Teixeira, J. A., & Aguilar, C. N. (2009). Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 24–27.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.02.001>
- Pandey, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35(10), 1153–1169.
[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)
- Rodriguez Couto, S. (2008). Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnology Journal*, 3(7), 859–870.
<https://doi.org/10.1002/biot.200800031>
- Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using

- solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Saleem, M., Tanvir, M., Akhtar, M. F., Iqbal, M., & Saleem, A. (2019). Antidiabetic potential of *Mangifera indica* L. cv. anwar ratol leaves: Medicinal application of food wastes. *Medicina (Lithuania)*, 55(7), 1–9. <https://doi.org/10.3390/medicina55070353>
- Singh Nee Nigam, P., & Pandey, A. (2009). Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* (Issue July). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7>
- Sirohi, R., Tarafdar, A., Singh, S., Negi, T., Gaur, V. K., Gnansounou, E., & Bharathiraja, B. (2020). Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Bioresource Technology*, 314(May), 123771. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123771>
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011>
- Tao, N. guo, Shi, W. qing, Liu, Y. jin, & Huang, S. rong. (2011). Production of feed enzymes from citrus processing waste by solid-state fermentation with *Eupenicillium javanicum*. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(5), 1073–1079. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02587.x>
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15638–15678. <https://doi.org/10.3390/ijms150915638>
- Teles, A. S. C., Chávez, D. W. H., Oliveira, R. A., Bon, E. P. S., Terzi, S. C., Souza, E. F., Gottschalk, L. M. F., & Tonon, R. V. (2019). Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. *Food Research International*, 120(October 2018), 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.083>

- Torres-León, C., Ramírez-Guzmán, N., Ascacio-Valdés, J., Serna-Cock, L., dos Santos Correia, M. T., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2019). Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* to enhance the phenolic contents and antioxidative activity of Mexican mango seed: A promising source of natural antioxidants. *Lwt*, 112(December 2018), 108236. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.06.003>
- Valenzuela B., A., Sanhueza, J., Valenzuela, R., & Morales I., G. (2014). Alimentos funcionales, Nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista Chilena de Nutricion*, 41(2), 198–204. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182014000200011>
- Wang, F., Terry, N., Xu, L., Zhao, L., Ding, Z., & Ma, H. (2019). Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: A review. *Microorganisms*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120665>
- Wen, L., Zhang, Z., Sun, D. W., Sivagnanam, S. P., & Tiwari, B. K. (2020). Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(11), 1826–1841. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1602823>
- Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., & Skaltsounis, A. L. (2012). Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. *Journal of Supercritical Fluids*, 67, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.03.014>
- Zhang, Y., Chen, Q., Liu, M. yang, Ruan, J. ya, Yu, H. yang, Li, J., & Wang, T. (2019). Effects of benzophenones from mango leaves on lipid metabolism. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 67(7), 634–639. <https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00905>
- Žugčić, T., Abdelkebir, R., Alcantara, C., Collado, M. C., García-Pérez, J. V., Meléndez-Martínez, A. J., Režek Jambrak, A., Lorenzo, J. M., & Barba, F. J. (2019). From extraction of valuable compounds to health promoting benefits of olive leaves through bioaccessibility, bioavailability and impact on gut microbiota. *Trends in Food Science and Technology*, 83(August 2018), 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.005>